



**UNIVERSIDAD ESTATAL**  
**“PENÍNSULA DE SANTA ELENA”**  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

**“CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA BACTERIANO DE LA  
CONCHA NEGRA (*Anadara tuberculosa*. Sowerby, 1833) EN EL  
SANTUARIO DE LOS MANGLARES DE TUMBES”**

**TESIS DE GRADO**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO MARINO**

**JOSÉ RUPERTO GONZÁLEZ PAZMIÑO**

**LA LIBERTAD – ECUADOR**

**2015**



**UNIVERSIDAD ESTATAL**

**“PENINSULA DE SANTA ELENA”**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA**

**“CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA BACTERIANO DE LA  
CONCHA NEGRA (*Anadara tuberculosa*. Sowerby, 1833) EN EL  
SANTUARIO DE LOS MANGLARES DE TUMBES”**

**TESIS DE GRADO**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO MARINO**

**Autor:**

José R. González Pazmiño

**Tutor:**

Quim. Mery Ramirez Muñoz M,Sc.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2015

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad por las ideas, hechos, investigaciones y resultados expuestos en esta tesis, pertenece exclusivamente al equipo investigativo de INCABIOTEC S.A.C., y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA. (UPSE)

---

**José R. González Pazmiño**

C.I.: 0919475715

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme cristalizar mi anhelo.

A mis padres que con mucho esfuerzo me guiaron por el sendero de la superación.

A INCA BIOTEC SAS. Que con su sistema de integración de jóvenes investigadores, he tenido la oportunidad de realizar uno de los temas que mejor se ajusta a mi perfil y agrado.

**José R. González Pazmiño**

## **AGRADECIMIENTO**

A las **autoridades y personal Académico** de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional.

**A mis padres:** Martha Pazmiño y Ruperto González que me han acogido tanto tiempo bajo su regazo, apoyado en cada una de mis actividades sacrificando sus sueños por la de sus hijos.

**A la Sta.:** Licenciada en biotecnología. Vania Cedrón Maguiña por motivarme y dar seguimiento en el análisis de datos.

**A mi tutora de tesis:** a la bióloga Mery Ramírez Muñoz; con su conocimiento en elaboración de tesis de grado y facilidades académicas, agilitó los procesos de corrección, revisión, brindando una buena asesoría de tesis.

**A mis asesores de empresa:** Bennoit Diringer y krizia Prettel por dar seguimiento y facilitar los procesos mediante una buena gestión del Proyecto Concha negra.

**A La dirección de la carrera de Biología Marina:** en especial a la Lcda. Mayiya Tigrero, que gracias a sus esfuerzos en su puesto de trabajo hizo lo imposible por ayudar a muchos tesisistas a terminar sus trámites para hacer de sus sustentaciones algo posible.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

Ing. Lilia Valencia Cruzaty

Rector

---

Ing. Jimmy Candell Soto

Vicerrector

---

Ing. Johnny Chaverria Ph.D.

Decano Facultad Ciencias del Mar

---

Blga. Dennis Tomalá M,Sc.

Director Escuela Biología M.

---

Quim. Mery Ramírez Muñoz M,Sc.

Docente tutor

---

Ab. Joe Espinoza Ayala, Mgt.

Secretario General

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	xxiii
ABSTRACT .....	xxiv
INTRODUCCIÓN .....	xxv
JUSTIFICACIÓN .....	xxxii
OBJETIVO GENERAL .....	xxxiv
1.1. GENERALIDADES DE LOS BIVALVOS .....	1
1.1.1. Rol ecológico de los bivalvos.....	1
1.1.2. Bivalvos como nuevo auge en la acuicultura y alimentación mundial .....	3
1.1.3. Potencial biotecnológico.....	4
1.1.4. Características de la familia Arcidae.....	5
1.2. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA DE <i>Anadara tuberculosa</i> .....	5
1.3. BACTERIAS SIMBIÓTICAS.....	7
1.3.1. Simbiontes en hemolinfa de invertebrados .....	8
1.3.2. Concepto de Hologenoma .....	9
1.4. CLASIFICACIÓN PROCARIOTA.....	11
1.4.1. Filo Proteobacteria .....	12
1.5. PATÓGENOS MÁS COMUNES EN BIVALVOS .....	21



1.5.1.	Factores patógenos en Vibrios.....	22
1.5.2.	Factores patógenos en Pseudomonas.....	23
1.5.3.	Factores patógenos en Aeromonas.....	23
1.5.4.	Septicemia .....	24
1.6.	PRINCIPIOS ACTIVOS EXTRACELULAR .....	25
1.6.1.	Péptidos antimicrobianos de origen invertebrado .....	25
1.6.2.	Péptidos antimicrobianos de origen procariota .....	26
1.7.	ACCIÓN PROBIÓTICO .....	27
1.7.1.	Tratamientos de probióticos en bivalvos.....	28
1.7.2.	Uso de probióticos en bivalvos .....	29
1.8.	METAGENÓMICA .....	30
1.8.1.	Genes de referencia taxonómica en procariontas.....	31
1.8.2.	Metagenómica dirigida al gen 16SrRNA .....	32
1.9.	NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS).....	33
1.9.1.	ION TORRENT Pirosecuenciación .....	34
1.10.	TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN .....	35
1.11.	MANEJO DE DATOS DE METAGENÓMICA.....	37
1.11.1.	MG-RAST .....	38
	MARCO METODOLÓGICO .....	51
2.1.	OBTENCIÓN DE MUESTRA .....	51

2.1.1.	Lugar de estudio.....	51
2.1.2.	Muestreo .....	52
2.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	54
2.3.	MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS .....	55
2.4.	AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN AGAR MARINO .....	56
2.5.	EXTRACCIÓN DE LA HEMOGLOBINA & TRACTO DIGESTIVO.. .....	56
2.6.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	58
2.7.	PCR DEL GEN 16SRRNA .....	60
2.8.	PREPARACIÓN DE BIBLIOTECA IonTorrent™ .....	61
2.9.	ENVÍO DE AMPLICÓN 16SRRNA A SECUENCIACIÓN SANGER .....	61
2.10.	ANÁLISIS DE DATOS .....	62
2.10.1.	Pretratamiento de archivos Metagenómica .....	62
2.10.2.	Alineamiento e identificación molecular.....	63
2.10.3.	Análisis filogenético de cepas aisladas .....	64
2.10.4.	Comparación de comunidades metagenómica.....	64
2.10.5.	Búsqueda en Base de datos NCBI .....	65
3.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	66
3.1.	TESTEO DE MUESTRAS.....	67

3.1.1.	Calidad de Hemoglobina .....	67
3.1.2.	Amplificación del 16SrRNA.....	68
3.1.3.	Absorbancia de ADN .....	70
3.2.	GENERALIDADES DE LA SUMISIÓN DE DATOS.....	71
3.3.	ANÁLISIS TAXONÓMICO .....	73
3.3.1.	Cepas cultivables .....	77
3.4.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	80
3.4.1.	Filogenia de especies y phylum de muestras del estómago. ... .....	80
3.4.2.	Filogenia de especies de la hemoglobina de <i>A. tuberculosa</i> .	85
3.4.3.	Filogenia total de especies en el microbioma de <i>A. tuberculosa</i> .....	86
3.4.4.	Filogenia de Bacterias aisladas y cultivadas.....	88
3.5.	DIVERSIDAD DE OTU' s .....	89
3.6.	COMPARACIÓN METAGENÓMICA.....	90
3.7.	COMPARACIÓN METAGENÓMICA ENTRE ESPECIES ESTUARINAS.....	97
3.8.	BASE DE DATOS BIOPROSPECCIÓN PROBIÓTICO.....	101
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	104
4.1.	Conclusiones .....	104

4.2. Recomendaciones .....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	110
ANEXOS.....	1

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1</b> <i>A. tuberculosa</i> . FUENTE. (Fischer, Organizació de les Nacions Unides per a l' Agricultura i l' Alimentació, 1995) .....	6
<b>Ilustración 2</b> Resumen de Árbol filogenético de bacterias computarizado desde proteínas representativas. Fuente: (Daubin, 2002).....	12
<b>Ilustración 3</b> Un árbol filogenético desraizado de el filo proteobacteria, y algunas bacterias relacionadas. Se observa un agrupamiento por cada grupo del filo siendo la gammaproteobacteria una de las más diversas. FUENTE: (Daubin, 2002) .....	13
<b>Ilustración 4</b> Área de estudio donde se extrajeron los organismos de <i>A. tuberculosa</i> . FUENTE: googlemaps.....	52
<b>Ilustración 5</b> Diseño experimental de la metagenómica de bacterias asociadas a la hemoglobina e intestino de <i>Anadara tuberculosa</i> .....	54
<b>Ilustración 6</b> Disposición y estructura de Células de la hemoglobina.....	67
<b>Ilustración 7</b> Distribución de las células de hemocitos de la concha negra, fagocitos con la flecha negra. ....	68
<b>Ilustración 8</b> Amplicón del gen 16S de bacterias de el contenido intestinal de la Concha negra. El amplicon presenta unas 1.5k pares de base. ....	69
<b>Ilustración 9</b> Los niveles de OTU's presentes por género a nivel gastrointestinal de la Concha negra.....	73

<b>Ilustración 10</b> Proporciones de OTU's a nivel de género en el contenido intestinal de la Concha negra.....	74
<b>Ilustración 11</b> Niveles de OTU's en la hemoglobina de la Concha negra. ....	75
<b>Ilustración 12</b> Proporciones de OTU's de la hemoglobina de la Concha negra. ....	76
<b>Ilustración 13</b> Árbol filogenético circular proporcional de los phylum encontrados en los metagenomas del estómago de <i>A. tuberculosa</i> . Parte 1 .....	81
<b>Ilustración 14</b> Árbol filogenético circular proporcional de los phylum encontrados en los metagenomas del estómago de <i>A. tuberculosa</i> . Parte 2 .....	82
<b>Ilustración 15</b> Árbol filogenético de las bacterias del tracto digestivo de la Concha negra parte 1. ....	83
<b>Ilustración 16</b> Árbol filogenético de las bacterias del tracto digestivo de la Concha negra parte 2. ....	84
<b>Ilustración 17</b> Filogenia de las bacterias extraídas de la hemoglobina de la Concha negra. ....	85
<b>Ilustración 18</b> Filogenia total de la microbiota de la Concha negra <i>Anadara tuberculosa</i> . Parte 1.....	86
<b>Ilustración 19</b> Filogenia total de la microbiota de la Concha negra <i>Anadara tuberculosa</i> . Parte 2.....	87

<b>Ilustración 20</b> Árbol filogenético de especies cultivadas aisladas de la hemoglobina y estómago de la Concha negra. Fuente: <b>Concepto Azul</b> .88	.88
<b>Ilustración 21</b> Curva de rarefacción de diversidad de OTU's de los metagenomas de la Concha negra .....	89
<b>Ilustración 22</b> Heatmap de especies agrupadas por phylum.....	90
<b>Ilustración 23</b> Heatmap de los metagenomas agrupados por phylum....	91
<b>Ilustración 24</b> Mapa de distribución 2D mediante distancias de Bray Curtis. Las muestras de hemoglobina se encuentran agrupadas mientras que las muestras de intestino presentan metagenomas totalmente aislados e independientes uno de otra mostrando poca uniformidad. ....	92
<b>Ilustración 25</b> Perfil procartota de los metagenomas secuenciados. Siendo el philo proteobacteria y tenericutes los más dominantes relativamente. .93	.93
<b>Ilustración 26</b> Barchart de escalas taxonómicas de el orden alphaproteobacteria de la hemoglobina de <i>Anadara tuberculosa</i> .....	94
<b>Ilustración 27</b> Especies encontrada en el orden Betaproteobacteria de la hemoglobina de <i>Anadara tuberculosa</i> .....	95
<b>Ilustración 28</b> Taxones encontrados en el orden gama-proteobacteria de la hemoglobina y estómago de <i>Anadara tuberculosa</i> .....	96
<b>Ilustración 29</b> Comparación de metagenomas entre familias del orden de gamma-proteobacteria de <i>Anadara tuberculosa</i> (azul), <i>Crassostrea virginica</i> (verde), y <i>Mytilus galloprovincialis</i> (rojo). FUENTE: (Craft et al., 2010; King et al., 2012).....	97

<b>Ilustración 30</b> Comparación de abundancia de vibrios entre tres especies de organismos: <i>Anadara tuberculosa</i> (azul), <i>Crassostrea virginica</i> (verde), y <i>Mytilus galloprovincialis</i> (rojo). FUENTE: (Craft et al., 2010; King et al., 2012) .....	98
<b>Ilustración 31</b> Comparación metagenómica del filo Firmicutes en <i>Anadara tuberculosa</i> (azul), <i>Crassostrea virginica</i> (verde), y <i>Mytilus galloprovincialis</i> (rojo). FUENTE: (Craft et al., 2010; King et al., 2012) .....	99
<b>Ilustración 32</b> Cuadro heatmap comparativo de microbiomas de tres tipos de especies estuarinas. FUENTE: (Craft et al., 2010; King et al., 2012)	100
<b>Ilustración 33</b> Disección bilateral de la Concha negra. Flecha negra, biseras y estómago. Flecha roja: músculo aductor y parte del pie. ....	2
<b>Ilustración 34</b> Disección y extracción de muestra de estómago de Concha negra. ....	2
<b>Ilustración 35</b> Buffer de extracción de DNA. ....	3
<b>Ilustración 36</b> Centrífuga de programación digital. ....	3
<b>Ilustración 37</b> Centrífugación de la suspensión de DNA. ....	4
<b>Ilustración 38</b> Migración de ADN por gel de agarosa al 2%. ....	4



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Algunas familias y géneros más comunes de bacterias alfa-proteobacteria, (Las especies con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.) .....	14
<b>Tabla 2</b> Algunos géneros y familias del grupo beta-proteobacteria, (los géneros con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.) .....	15
<b>Tabla 3</b> Algunos géneros y familias del grupo gamma-proteobacteria, (los géneros con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.) .....	17
<b>Tabla 4</b> Algunos géneros y familias del grupo delta-proteobacteria, (los géneros con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.) .....	18
<b>Tabla 5</b> Algunos géneros y familias del grupo epsilon-proteobacteria, (los géneros con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.) .....	19
<b>Tabla 6</b> Materiales y equipos e insumos de la actividad experimental. ....	55
<b>Tabla 7</b> Cuantificación de ADN con distintos niveles de absorbancia .....	70
<b>Tabla 8</b> Estadísticas y generalidades de la sumisión de metagenomas en MG-RAST. Por razones desconocidas la hemolinfa 3 no presenta estadística de submisión de datos. ....	71

<b>Tabla 9</b> Especies encontradas en el metagenoma de <i>A. tuberculosa</i> mostrando datos de abundancia y viabilidad de cultivo.....	78
<b>Tabla 10</b> Cepas de características no patógenas aún no registradas de interés de bioprospección probiótico.....	101
<b>Tabla 11</b> Base de datos de reportes de bacterias segun sus características y propiedades en el metagenoma de la Concha negra. ....	5

## **GLOSARIO**

### **Bacteremia**

Es la presencia de bacterias en la sangre. La sangre es normalmente un medio estéril, por lo tanto la detección de bacterias en la sangre es anormal., 25

### **Clados**

En biología, clado significa rama y se lo utiliza para designación de una parte de un árbol filogenético, 51

### **Epigenoma**

La epigenética es esencialmente el estudio de los factores externos o ambientales que convierten genes por intervalos y afectan cómo las células leen genes., 36

### **Eutrofización**

Acumulación de residuos orgánicos en el litoral marino o en un lago, laguna, embalse, etc., que causa la proliferación de ciertas algas., 2

### **Hologenoma**

La suma de la información genética del hospedador y su microbiota o simbiontes asociados., xxvi

### **Metagenómica**

La metagenómica es el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno (metagenoma) directamente a partir de muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar esas especies, xxix

### **Microbioma**

Es el total de microorganismos y su material genético colectivo presente en o sobre el cuerpo humano o en un determinado ambiente., xxvi

### **Microbiota**

También conocida como microflora es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano., xxix

### **Pellicípodo**

Es una clase del filo mollusca, xxiv

### **periostraco**

El periostraco es un revestimiento orgánico delgado o "piel" que es la capa más externa de la cáscara de muchos animales sin cáscara, incluidos los moluscos y braquiópodos., xxiv

### **Probióticos**

probiótico sería un aditivo microbiano vivo con un efecto benéfico en el huésped, la modificación de la microbiota asociada con el host o el medio ambiente, asegurando un uso óptimo de la alimentación o la mejora de su valor nutricional, la mejora de la respuesta del huésped contra la enfermedad, o conseguir una mejor calidad de su medio ambiente., xxvi

### **Sepsis**

Es la respuesta sistémica del organismo huésped ante una infección, con finalidad eminentemente defensiva., 25

### **Transcriptoma**

Es la suma de todos los ARNm que son producidos por el genoma en condiciones específicas., 36

## SIMBOLOGÍA

<b>m<sup>2</sup></b>	Metros cuadrados
<b>m</b>	Metros
<b>cm</b>	Centímetros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>ml</b>	Mililitro
<b>Ind</b>	Individuos
<b>sp.</b>	Especies
<b>%</b>	Porcentaje o ponderación
<b>µl</b>	Microlitros
<b>αD</b>	Diversidad alfa
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto

## **ABREVIATURAS**

**UFC** Unidades formadoras de colonias

**OTU** Operational Taxonomic units

**PCoA** Principal Coordinates of Analisis

**NCBI** National Center of Biotechnology Information

**DNA** Desoxiribonucleic acid

**RNA** Ribonucleic acid

**EDTA** Ethylenediaminetetraacetic acid

**dNTP's** Desoxinucleotide

**16SrRNA** Fragmento subunidad 16 del ácido ribonucleico

**CTAB** Cetyl trimethylammonium bromide

## RESUMEN

*Anadara tuberculosa* es una especie bandera del ecosistema manglar del Pacífico y es de alta importancia económica y social en varios países de América Latina occidental. Los estudios enfocados a la biología molecular de este bivalvo son escasos. Este estudio evaluó la composición de la microbiota total asociada a la concha negra mediante metagenómica dirigida al gen 16SARNr. Un total de 125000 secuencias fueron obtenidas por Secuenciación de última Generación ION TORRENT en muestras de aparato digestivos y de hemolinfas. En total se encontraron 77 OTU's distribuidos en 12 Phylum. Los resultados indicaron que los contenidos estomacales albergan una microbiota mucho más diversa que la hemolinfa con un promedio de especies de 125 y 20 respectivamente. Sin embargo, en ambos tipos de muestras el género *Vibrio* predomina con 95% de abundancia en la hemolinfa y 45% en el estómago. Se identificaron bacterias cultivables y no cultivables, patógenos y probióticos mediante revisión de bibliografía. Los análisis PCoA indican que la hemolinfa no presenta variaciones mientras que el metagenoma del estómago varía según el sitio de muestreo. Aunque falta determinar cuál es la participación del microbioma en la fisiología digestiva o inmunitaria de la concha negra, este estudio es el primer reporte de Metagenómica dirigida en la hemolinfa de invertebrados y el primer estudio de caracterización de la microbiota de la concha negra.

## ABSTRACT

*Anadara tuberculosa* is a flag species of high economic and social importance in several countries in Latin America West. The studies focused on the molecular biology of this bivalve are scarce. This study valued the composition of the total microbiota of the blood cockle mediated metagenomics of 16SrRNA. 125000 sequences were obtained by sequencing ION TORRENT bowel tissue and hemolymph. *Vibrio* diversity outperforms other host species found. The genus *Vibrio* is 95% of wealth in the hemolymph and 45% in the stomach. Culturable and non-culturable bacteria, pathogens and probiotics were identified by literature review. 77 OTU's distributed in 12 Phylum were found. The results indicate the stomach have more diversity of microbiota that hemolymph with a species average respectively. PCoA analyzes indicate that the hemolymph does not vary while the metagenome of the stomach varies the sampling site. The role of the microbiome of the blood cockle in the fisiology of digestive system or the hemolymph are still unknown. This is the first report of Metagenomic addressed in the hemolymph of invertebrates and the first study of microbial level in the blood cockle tissue characterization.



## INTRODUCCIÓN

La concha negra (Blood cockle) *Anadara tuberculosa*, es un molusco bivalvo lamelibranquio de la familia Arcidae, endémico del Pacífico Oriental. Presenta un periostraco con 33 a 37 costillas con coloración marrón a negro (Fischer, Organizació de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació, 1995). Su distribución comprende desde baja California hasta punta Malpelo en Perú.

La extracción del recurso concha constituye una de las pesquerías ancestrales más tradicionales del Perú desarrollándose principalmente en los ecosistemas manglares de Zarumilla, Puerto Pizarro y Corrales. Cabe resaltar que en el manglar de Tumbes existe una zona protegida conocida como El Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes (SNLMT) que fue creado mediante D.S. 018-88-AG donde también se realizan faenas de extracción.

La comercialización de la concha negra abarca dos especies: *Anadara tuberculosa* (concha negra) y *Anadara similis* (Concha huequera) y sostiene

la economía de miles de familias asociadas a su extracción y comercio en Perú como en toda América Latina (Beitil, 2010). La extracción actual de Concha Negra, está limitada por la talla mínima de captura mediante 2 resoluciones que fueron implementadas para mitigar la rápida caída poblacional del recurso. Sin embargo, esas han mostrado ser ineficaces tal como lo reflejan los registros de captura del año 2008, donde se reportaron aproximadamente 5 Toneladas de conchas negras extraídas a diferencia del año 1998, donde se obtuvieron cerca de 32 Toneladas (IMARPE, 2009). Su abundancia en el santuario Nacional de los manglares de Tumbes fue recientemente evaluado a 1,32 individuos por metro cuadrado (Flores, Perú. Ministerio del Ambiente. Instituto Geofísico del Perú, 2013). Su abundancia en el santuario Nacional de los manglares de Tumbes fue recientemente evaluado a 1,32 individuos por metro cuadrado (Flores, Perú. Ministerio del Ambiente. Instituto Geofísico del Perú, 2013).

Como consecuencia, se ha reportado que *A. tuberculosa* se encuentra sobreexplotada en el santuario de Tumbes, encontrándose por debajo del 74% de la biomasa al máximo rendimiento sostenible (Abanto and Martin, 2013). Esta situación dramática de sobreexplotación es generalizable a todos los manglares de Perú y de Ecuador.

El posible impacto socio-económico-ecológico de la desaparición de este recurso emblemático del ecosistema manglar ha conducido a proyectos de producción de semilla en condiciones artificiales de laboratorio en diferentes países latinoamericanos; en México donde se reporta las primeras producciones de semillas (Robles Mungarray 1999) asociadas a operaciones de cultivo (García-Domínguez et al., 2008; Medina and René, 2005; Ortiz et al., 2003) y fuertemente producido en el Salvador desde el 2005 (GALDAMEZ CASTILLO et al., 2007).

Últimamente, se realizó producciones de semillas en Perú (Diringer et al., 2012) y recientemente en Ecuador (Concepto Azul 2014) con fines; 1) de repoblamiento por siembra masiva de semillas, y 2) como especie acuícola alternativa que podría ser cultivada de forma familiar debido a su bajo costo de producción. La originalidad de estos 2 últimos es que integraron de forma temprana la domesticación de esta especie nativa con la prevención de enfermedades mediante diagnóstico molecular y la evaluación de la diversidad genética a través de la utilización del gen constitutivo COI como marcador (Diringer et al., 2012).

En Perú, la producción de semilla ha sido exitosa, pero con problemas de mortalidades durante la siembra y el engorde de la semilla en algunas zonas experimentales de cultivo. Las fluctuaciones de salinidades

aparecieron como un factor abiótico de riesgo predominante con mortalidades relacionadas en particular con la baja salinidad (Diringer et al., 2012).

En Ecuador, las operaciones de reproducción se confrontaron a eventos de mortalidades en reproductores extraídos de Puerto Hualtaco (Provincia de El Oro), San Lorenzo (Provincia de Esmeraldas) y la Isla Puná (Provincia del Guayas) que llevaron al diagnóstico de un *Perkinsus* sp. aparentado a *P. chesapeaki*.

En ambos casos, tanto a nivel reproductores como larvicultura los cultivos sufrieron también bacteriosis que fueron principalmente asociadas a *Vibrios* y *Pseudomonas*.

Teniendo en cuenta que *A. tuberculosa* posee un crecimiento de 0.01 a 1.94 mm/mes (Flores, 2010) y una tasa de fertilidad alta (Jordán and Gómez, 2006), en nuestro país aún no se ha podido cerrar el ciclo debido a la falta de diversificación de la industria de la acuicultura (Blacio Game, 2002). Sin embargo existen publicaciones de Cenaím-Espol (Cobeña and Alberto, 2014; Reynoso-Granados et al., 2012; Salazar and Blacio, 2002) que han demostrado interés en la producción de este bivalvo..

Dentro de la cría de moluscos, una serie de factores biológicos como algunos microorganismos asociados a enfermedades de bivalvos han provocado severas mortalidades en países de Europa. (Allam et al., 2000; Labreuche et al., 2006; Wendling et al., 2014). Trabajos previos se han enfocado en la patogenicidad y virulencia de algunas de estas cepas, centrándose en de *V. tubiashii* que ha dado una mortalidad significativa cultivos de ostra, abalón y varios moluscos en general (Mersni Achour et al., 2014; Travers et al., 2014).

Todos esos microorganismos que forman parte su microbioma, al igual que todos los factores biológicos presentes en todos los seres vivos, establecen relaciones sinérgicas, permiten la coexistencia de sus hospederos en sitios donde habitan bacterias patógenas y patógenos oportunistas (Rosenberg et al., 2007). Una gran parte de este microbioma está compuesta por bacterias simbióticas que proveen ciertos beneficios al hospedador encontrándose en sitios como el sistema digestivo, tejidos musculares y la hemolinfa (Singh et al., 2013).

Como consecuente, el uso de probióticos en la acuicultura es una estrategia de prevención de enfermedades que tiene sus inicios desde 1920 (Sahu et al., 2008), utilizándose por primera vez en 1986 (Martinez Cruz et al., 2012). Facilitando la idea de domesticar e involucrar especies

bacterianas seleccionadas con características mutualistas con el fin de competir con microorganismos patógenos. Hace pocos años, emergió el concepto del hologenoma, que nació como una teoría de evolución que involucra el rol de microorganismos simbiotes y que últimamente se lo ha relacionado con los aislamientos y descripción de nuevos probióticos.

El estudio del hologenoma en invertebrados, ha llevado a descubrir nuevas formas de asociación bacteria-huésped, trabajos de Defer et al.,(2013) & Desriac et al., (2014) sugieren que interacciones bacterianas en la hemolinfa de moluscos son necesarias para llevar a cabo funciones de protección inmunológica. Aplacando la teoría de hace unos pocos años atrás, que se creía que la existencia de bacterias en la hemolinfa era una septicemia. Sin embargo, los probióticos que se han encontrado no poseen propiedades bactericidas, sino bacteriostáticas. Por otra parte, los estudios solo se han centrado en la descripción de bacterias cultivables como parte del hologenoma, obviando las bacterias no cultivables que representan generalmente entre el 90 al 99% de las bacterias totales presentes en una muestra biológica.

El objetivo de este trabajo es la caracterización molecular de cepas bacterianas cultivables y no cultivables de la hemolinfa y estómago de la

concha negra silvestre mediante el uso de metagenómica dirigida al 16SrRNA para la descripción del hologenoma.

## JUSTIFICACIÓN

Si se quiere optimizar la acuicultura de la concha negra *A. tuberculosa* se debe mejorar el conocimiento de la flora bacteriana asociada. Esto nos lleva al estudio de probióticos para prevenir enfermedades de origen bacteriano y tempranas mortalidades en larvicultura. Además se desconoce la diversidad microbiana que existe en la hemolinfa de un bivalvo que está expuesto a grandes cargas bacterianas del sedimento del manglar. Muy aparte, existe una carencia de información acerca de la diversidad microbiana, el potencial probiótico e interacciones ecológica que podrían tener con el bivalvo hospedador.

Es necesario conocer ¿Que microorganismos cultivables y no cultivables aislados de la sangre de la concha negra puedan ser usados en la acuicultura? Que mediante herramientas de bioinformática con bases de datos de NCIBI, se podrá reconocer taxonómicamente cada bacteria y junto con ella sus características y propiedades.

El estudio de la metagenómica es muy utilizado por la precisión de sus resultados, datos e información, resaltando el bajo costo de secuenciar



miles de nucleótidos. Se usará el servicio de Pirosecuenciación de PGM ION TORRENT para obtener secuencias de una metagenómica dirigida. El 16SrRNA es una subunidad del ribosoma siendo el más usado en taxonomía bacteriana. Se empleará la plataforma *On line* MG-RAST, por ser el software más completo para describir, disgregar y discriminar comunidades microbianas y a través de los datos producidos por metagenómica (Schloss et al., 2009).

Se espera que los resultados de este trabajo sean un aporte científico al concepto del hologenoma. Mediante el estudio de metagenómica se podrán conocer todo el genoma bacteriano simbiote en la hemoglobina de la concha negra. Este tipo de estudio es necesario para establecer bases y argumentos acerca de la microflora de la hemoglobina de la concha negra; junto con ello, la existencia de cepas bacterianas que podrían cumplir funciones probióticas.

Por último, es necesario recalcar que este trabajo representará al primer estudio de la microbiota total en la hemolinfa de invertebrados llevado a cabo con metagenómica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar molecularmente cepas bacterianas cultivables y no cultivables en la hemoglobina y estómago de la concha negra mediante el uso de metagenómica dirigida al gen 16SrRNA para la descripción del hologenoma bacteriano.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar la microbiota bacteriana de la hemoglobina y estómago.
- Identificar bacterias cultivables y no cultivables.
- Crear base de datos para la bioprospección de cepas de interés probiótico.

## **HIPÓTESIS**

Será posible caracterizar mediante metagenómica dirigida al 16SrRNA la microbiota asociada a *Anadara tuberculosa*.

# **CAPÍTULO 1**

## **MARCO TEÓRICO**

### **1.1. GENERALIDADES DE LOS BIVALVOS**

Los bivalvos son una clase del filo mollusca que presentan más de 13.000 especies mayormente marinas. Su distribución ecológica comprende la infauna, la epifauna y parasitismo en ciertos casos. Son simétricas teniendo dos conchas calcáreas unidas lateralmente por una charnela. Pueden ser sésiles mayormente aunque también existen especies móviles que incluso pueden nadar o reptar. Son filtradores de fitoplancton en gran parte, teniendo órganos especializados en la filtración del agua como palpos labiales y branquias filamentosas.

#### **1.1.1. Rol ecológico de los bivalvos**

Los organismos filtradores aportan al ecosistema con la remediación del agua eliminando gran cantidad de detritus y materia de fitoplancton.

Cuando abunda materia en suspensión, los bivalvos pueden servir como un importante vínculo entre procesos bénticos y planctónicos porque éstos filtran grandes volúmenes de partículas suspendidas en la columna de agua y lo sedimentan en forma de heces. (Dumbauld et al., 2009).

Efectos positivos medibles en las propiedades del agua son causados por la capacidad de filtración de bivalvos. Inclusive en muchas áreas de la acuicultura de las costas oestes de Norte América han tenido la experiencia desde hace tres décadas en reducir los niveles de eutrofización del agua por medio de estos organismos. (Glasoe and Christy, 2003).

Otra característica de biorremediación de los bivalvos son la alteración de las propiedades de los sedimentos. La construcción de bio-depósitos con cultivos reduce el tamaño de partícula en suspensión e incrementa el contenido orgánico. El enriquecimiento del sedimento trae a otros tipos de organismos bentónicos de características detritívoras como meiofauna epibéntica e infauna devolviendo los depósitos orgánicos como iones en el agua, de esta manera se cierra el ciclo de nutrientes en el medio.

### **1.1.2. Bivalvos como nuevo auge en la acuicultura y alimentación mundial**

El cultivo de organismos bivalvos tuvo origen en países europeos hace varios siglos. El inicio de la producción a nivel industrial fue dada por Estados Unidos al inicio de los 70's al momento de controlar contaminación, Bloom de algas, enfermedades y hábitats perdidos. La atención total se dio en los 80's con la siembra objetiva de bivalvos para consumo humano. (Glasoe and Christy, 2003) Desde 1983 la producción de bivalvos ha estado creciendo progresivamente un 3% anual, igualmente los valores de venta han tenido una alza de un 6% por año.

Actualmente existen varias tendencias de cultivo y producción de moluscos bivalvos. La Ostra del Pacífico es la especie que presenta una mayor producción debido a su tamaño, antecedentes y rápido crecimiento. De ahí han surgido nuevas tecnologías de cultivo como el Basket Cockle, (*Clinocardium nuttallii*), Blue mussel (*Mytilus edulis*), Geoduck Clam (*Panopea generosa*), Neck Clam (*Protothaca staminea*), Soft-Shell (*Mya arenaria*), Scallops (*Argopecten purpurata*), entre otros que aún se encuentran en desarrollo. (Green and Tracy, 2013) Como la concha negra (*Anadara tuberculosa*) en Latinoamérica.

### **1.1.3. Potencial biotecnológico**

Actualmente se cuenta con más de 13 000 especies de bivalvos con una amplia distribución entre marinos y dulceacuícolas. Estos a la vez dan un gran impacto al área de Acuicultura como recurso alimenticio con un gran potencial económico en acuicultura social. (David and Savini, 2011).

Otra de las mejores aplicaciones biotecnológicas que presentan es la efectividad de las branquias de los bivalvos para tomar del medio acuático, solutos orgánicos e inorgánicos por la gran área de superficie y la alta vascularización de sus branquias. Branquias que terminan siendo utilizados para la biorremediación de aguas por su alta capacidad de filtración de partículas. (Battelle Memorial, 1994).

Actualmente la acuicultura de moluscos y bivalvos ha incorporado nuevas tendencias y aplicaciones de la biotecnología como la microbiología, el estudio genético, el uso de enzimas, probióticos, hormonas, etc. (Gomez-Chiarri, 2012; Ogara et al., 2002) El reciente descubrimiento de los probióticos ha hecho de la acuicultura una práctica eficiente. El aislamiento

de hormonas ha permitido mejorar los efectos de madurez inducida artificialmente en moluscos y otras especies. Una de ellas es la hormona adipokinetica (AKH) homóloga a la gonadotropina. (Börjesson, n.d.; Johnson et al., 2014; Scott, 2012).

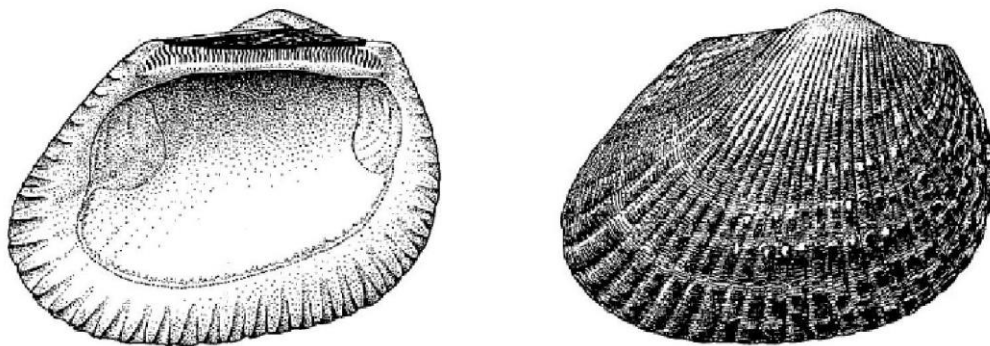
#### **1.1.4. Características de la familia Arcidae**

El nombre más común de esta familia es de conchas arcas proveniente de su nombre en inglés (Ark clam). Actualmente existen unas 200 especies alrededor del mundo y presentan distintas formas y tamaños. Presentan en su mayoría una coloración blanquecina-calcárea o crema en la concha. En vida, exhiben una coloración café a negro en el periostraco junto con vellosidades. Esta familia se caracteriza también por poseer una charnela en forma de una recta bisagra con una fila de numerosas denticiones que acoplan perfectamente siendo dimiarios en su mayoría.

#### **1.2. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA DE *Anadara tuberculosa***

*Anadara tuberculosa* es uno de los bivalvos de mayor importancia económica a lo largo de la costa del pacífico Oeste. Está distribuida en una

franja marítima que comprende desde el golfo de California hasta Tumbes, Perú. (Abanto and Martin, 2013; Jordán and Gómez, 2006; Medina and René, 2005; Salazar and Blacio, 2002). La concha negra se encuentra en manglares, fijada a los sustratos duros de las raíces del mangle sumergidas en el fango o arcilla dentro de la zona intermareal. Presenta asociación con los mangles *Rhizophora harrisoni*, *R. mangle*, *Pelliciera rizophorae*. (Campos et al., 1990).



**Ilustración 1** *A. tuberculosa*. FUENTE. (Fischer, Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació, 1995)

En Ecuador, se ha referenciado 4 provincias principales de extracción del recurso concha negra; El Oro, Guayas, Manabí y Esmeraldas. Algunos autores reportaron el estado socio-económico del recurso concha negra en puntos como puerto Hualtaco de El Oro y Muisne-Las Manchas de



Esmeraldas (Beitil, 2010) en la isla Puná provincia del Guayas (Lomas et al., 2011).

### **1.3. BACTERIAS SIMBIÓTICAS**

Son bacterias que cumplen un rol de interacción biológica y relación estrecha con un organismo de otra especie considerándose como un hospedador. Organismos procariotas que en su mayoría presentan una tendencia y asociación a los tractos intestinales de organismos celomados.

Consisten en un complejo de comunidades de especies de microorganismos que dan funciones de acuerdo al tipo de relación que presentan. Por ejemplo la flora bacteriana del tracto digestivo de vertebrados contribuye en la fermentación de sustancias como carbohidratos indigeribles y la absorción de ácidos grasos cortos. Muchas de las bacterias intestinales juegan un papel importante en la síntesis de vitamina B, vitamina K así como la metabolización de los ácidos biliares, esteroides y xenobióticos. (Cummings and Macfarlane, 1997).

### 1.3.1. Simbiontes en hemolinfa de invertebrados

Poco se sabe de la flora bacteriana de la hemolinfa de invertebrados y mucho menos por análisis de metagenómica que permiten identificar bacterias cultivables y no cultivables. Los estudios más rescatados afirman que es normal encontrar bacterias en la sangre de invertebrados (Cardinaud et al., 2014; Desriac et al., 2014; Wendling et al., 2014). Estas a la vez cumplen una función aún desconocida. Por ejemplo tomamos al red swamp crawfish *Procambarus clarkii* que presenta una variedad asombrosa de flora bacteriana que aumenta significativamente en base a la temperatura. (Scott and Thune, 1986) Otro ejemplo es el cangrejo azul *Callinectes sapidus* que presenta mayor flora bacteriana en la hemolinfa de los machos que las hembras con picos altos en estaciones de verano. (Colwell et al., 1975) Así mismo otra investigación con el mismo organismo revela que la media normal de bacterias en la hemolinfa de organismos sanos es de  $3.0 \times 10^5$ . (Tubiash et al., 1975).

En insectos como la *Galleria mellonella* el rol de la hemolinfa como inhibidor de crecimiento bacteriano ha sido investigada. (Chadwick, 1975). Así mismo en *Solenopsis invicta* se estudió la cantidad de microorganismos alojados en la hemolinfa de la reina, que comparados con las larvas de *S. invicta* evidencia transferencia vertical. El análisis del 16S identificó que las

bacterias más comunes en hemolinfa son los *Bacillus sp.*, y *Staphylococcus sp.* (Tufts and Bextine, 2009)

Con respecto a moluscos, tenemos un estudio hecho en la ostra del pacífico *C. virginica* que presenta una cantidad normal de  $1.4 \times 10^2$  a  $5.6 \times 10^2$  UFC/ml. Las bacterias se identificaron por cultivo en placa siendo las más abundantes el género *Vibrio*, *Pseudomona* y *aeromonas* (Karim et al., 2013). Otro organismo de estudio fue el mejillón caballo *Modiolus modiolus* que presentaba unas características similares con proporciones de *Pseudomonas* siendo las más abundantes con un 61.3%, *Vibrio* 27.0%, y *aeromonas* 11.7%. (Olafsen et al., 1993)

### **1.3.2. Concepto de Hologenoma**

El concepto de hologenoma fue introducido por primera vez por (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2011) mencionando el rol que poseen los microorganismos en la evolución de las especies. El término viene de la etimología de “holo=todo” y “genoma= información genética” definiéndose como la suma de la información genética del hospedador y su microbiota o simbiontes asociados.

Trabajos de Chandler y Turelli (2014) mencionan la importancia que presentan los microorganismos en la salud del hospedador y en su evolución. Sin embargo, se ha mencionado que en teoría, la microbiota o hologenoma puede ser usado como probióticos (Singh et al., 2013; Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008).

Hasta el momento, los estudios de Hologenoma se han centrado en invertebrados marinos, como en corales (Cavalcanti et al., 2014; Rosenberg et al., 2007; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2011), seguido por moluscos bivalvos (Desriac et al., 2014), moluscos terrestres (Brucker and Bordenstein, 2013), hasta llegar a estudios de mamíferos roedores llegando a demostrar un principio de divergencia evolutiva en los microorganismos de su contenido intestinal de dos tipos de especies e híbridos. (Wang et al., 2015)

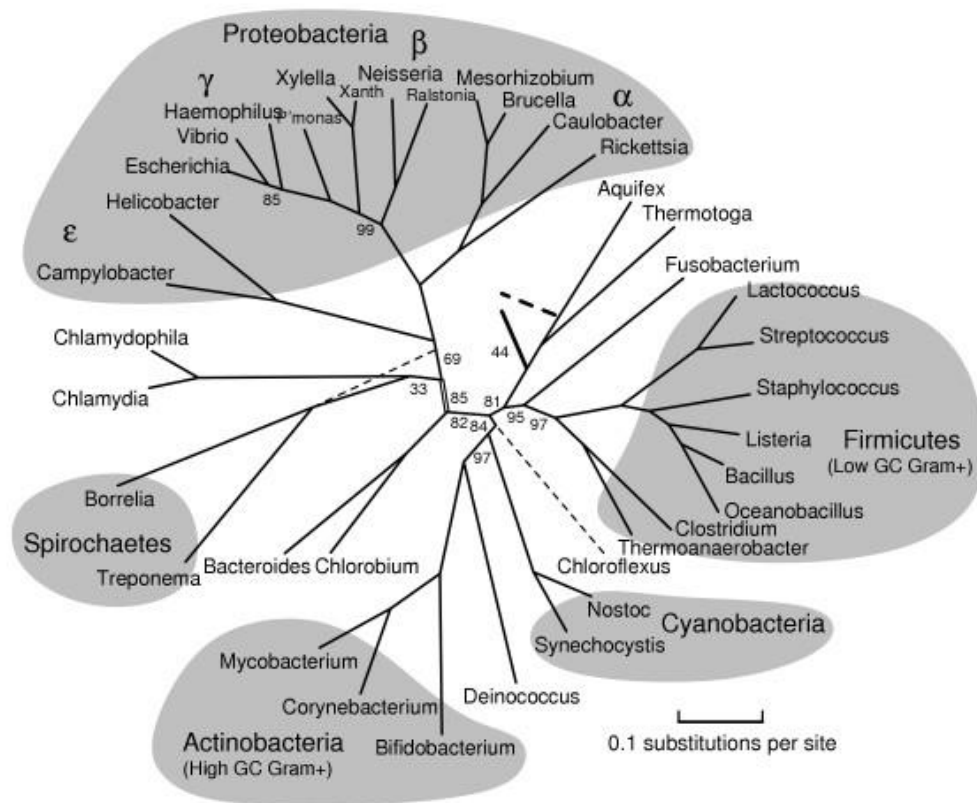
Muchos términos como meta-genoma hereditaria que es un conjunto de factores genéticos de una comunidad microbiana que ocupan o comparten un cierto nicho ecológico, simbio-genoma que es un sistema funcionalmente integrado de patrones “genes simbióticos” forman parte del

concepto de hologenoma, que es un sistema hereditario entero de un organismo originado simbióticamente. (Provorov and Tikhonovich, 2014).

#### **1.4. CLASIFICACIÓN PROCARIOTA**

Según la taxonomía del NCBI hay dos dominios procariontes que se subdividen en: bacteria y archaea. (Suyama and Bork, 2001) El dominio Archaea presenta los siguientes filos: Aenigmarchaeota, Diapherotrites, Crenarchaeota, Euryarchaeota, Geoarchaeota, Nanoarchaeota, Korarchaeota, Nanohaloarchaeota, Parvarchaeota, Thaumarchaeota.

El dominio Bacteria presenta más de 30 filos de bacterias entre ellas se encuentran las siguientes: Actinobacteria, Aquificae, Armatimonadetes, Bacteroidetes-Chlorobi, Caldiseptica, Chlamydiae-Verrucomicrobia, Chloroflexi, Chrysiogenetes, Cyanobacteria, Deferribacteres, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Elusimicrobia, Fibrobacteres-Acidobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospinae, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Thermodesulfobacteria, Thermotogae.

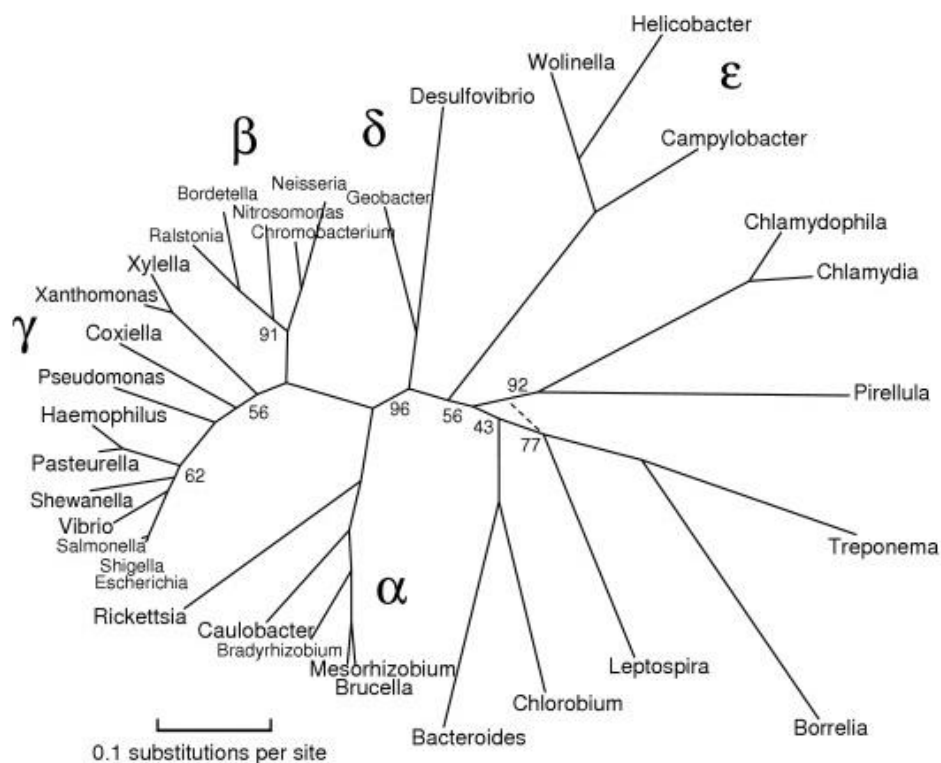


**Ilustración 2** Resumen de Árbol filogenético de bacterias computarizado desde proteínas representativas. Fuente: (Daubin, 2002).

### 1.4.1. Filo Proteobacteria

El conjunto de bacterias de mayor importancia y más abundante siendo estas probióticas o patógenas son el filo protobacteria. Es un phylum de bacterias purpuras y su relatividad con una rama del árbol de eubacterias. Su etimología viene del griego “*Proteus*” debido a su gran diversidad de

formas que presentan. En este grupo predominan la tinción gram-negativo su clasificación se basa en la homología de secuencias de nucleótidos homólogos del 16SrRNA. (Tamames, 2001) Se pueden dividir en Alphaproteobacteria, gammaproteobacteria, betaproteobacteria, deltaproteobacteria y epsilonproteobacteria.



**Ilustración 3** Un árbol filogenético desraizado de la filo proteobacteria, y algunas bacterias relacionadas. Se observa un agrupamiento por cada grupo del filo siendo la gammaproteobacteria una de las más diversas. FUENTE: (Daubin, 2002)

### 1.4.1.1. Alphaproteobacteria

Es un grupo del filo proteobacteria compuesto mayormente de dos fenotipos mayores: bacterias no-sulfurosas púrpuras y bacteria aeróbica contenedor de bacterioclorofila. Por lo general en su mayoría son autótrofos. Algunos ejemplos tenemos: Nitrobacter, Xantobacter, Rhizobium, Rickettsiae, entre otros.

**Tabla 1** Algunas familias y géneros más comunes de bacterias alfa-proteobacteria, (Las especies con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.)

<b>Alphaproteobacteria</b>		
Anaplasmataceae	Caulobacteraceae	Holosporaceae
Anaplasma	Caulobacter	
Ehrlichia		Hyphomicrobiaceae
Neorickettsia	Rhodobacteraceae	Azorhizobium
	Paracoccus	Hyphomicrobium
Bartonellaceae	Rhodobacter	Rhodomicrobium
Bartonella	Rhodovulum	Xanthobacter
	Roseobacter	
Beijerinckiaceae		Methylobacteriaceae
	Rhodospirillales	Methylobacterium
Bradyrhizobiaceae	Acetobacteraceae	
Afipia	Rhodospirillaceae	Methylocystaceae
Bradyrhizobium		Methylosinus
Nitrobacter	Rickettsiaceae	



Rhodopseudomonas	Rickettsiae	Phyllobacteriaceae
	Wolbachia	Mesorhizobium
Brucellaceae		
Brucella	Sphingomonadaceae	Rhizobiaceae
Ochrobactrum	Sphingomonas	Agrobacterium
	Zymomonas	Rhizobium
		Sinorhizobium

---

#### 1.4.1.2. Betaproteobacteria

Es un grupo de el filo proteobacteria compuesto de chemoheterotrofos y achemoautotrofos que derivan nutrientes de la descomposición de materia organica. Un claro ejemplo de este Phylum son los géneros Nitrosomonas, Methylobacillus, Comamonas, Thiobacillus.

**Tabla 2** Algunos géneros y familias del grupo beta-proteobacteria, (los géneros con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.)

---

<b>Betaproteobacteria</b>	
Alcaligenaceae	Neisseriaceae
Achromobacter	Chromobacterium
Alcaligenes	Eikenella
Bordetella	Kingella
Taylorella	Neisseria

Burkholderiaceae	Vitreoscilla
Burkholderia	Nitrosomonadaceae
Cupriavidus	Nitrosomonas
Ralstonia	
Comamonadaceae	Oxalobacteraceae
	Herbaspirillum
Comamonas	Oxalobacter
Delftia	formigenes
Leptothrix	Rhodocyclaceae
Sphaerotilus	Azoarcus
	Thauera
Gallionellaceae	Zoogloea
Hydrogenophilaceae	Spirillaceae
Thiobacillus	Spirillum
Methylophilaceae	
Methylobacillus	
Methylophilus	

---

#### 1.4.1.3. Gammaproteobacteria

Es un grupo de el filo proteobacteria compuesto de anaerobios facultativos y bacterias Gram-negativas fermentativas. Es el grupo más diverso en comparación con los otros. Una característica de este grupo es la capacidad de descomponer materia orgánica y relacionarse con su hospedero de forma positiva como negativa. Como ejemplo tenemos al género Aeromonas, Pseudoalteromonas, Vibrio, Xantomonas, entre otras.

**Tabla 3** Algunos géneros y familias del grupo gamma-proteobacteria, (los géneros con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.)

<b>Gammaproteobacteria</b>		
Acidithiobacillus	Erwinia	Psychrobacter
Acidithiobacillus thiooxidans	Escherichia	
	Hafnia	Oceanospirillaceae
Aeromonadaceae	Klebsiella	Marinomonas
Aeromonas	Kluyvera	
	Morganella	Pasteurellaceae
Alcanivoraceae	Pantoea	Actinobacillus
	Pectobacterium	Aggregatibacter
Alteromonadaceae	Photorhabdus	Haemophilus
Alteromonas	Plesiomonas	Mannheimia
Marinobacter	Proteus	Pasteurella
Moritella	Providencia	
Pseudoalteromonas	Rahnella	Piscirickettsiaceae
Shewanella	Salmonella	Piscirickettsia
	Serratia	
Cardiobacteriaceae		Pseudomonadaceae
Cardiobacterium	Shigella	Azotobacter
Dichelobacter nodosus	Wigglesworthia	Cellvibrio
	Xenorhabdus	Pseudomonas
Chromatiaceae	Yersinia	
Chromatium		Succinivibrionaceae
Halothiobacillus	Francisella	Anaerobiospirillum
Thiocapsa	Francisella tularensis	
		Thiotrichaceae
Coxiellaceae	Halomonadaceae	Beggiatoa
Coxiella	Chromohalobacter	Thiothrix
	Halomonas	
Ectothiorhodospiraceae		Vibrionaceae
Ectothiorhodospira	Legionellaceae	Aliivibrio
Halorhodospira halophila	Legionella	Listonella
		Photobacterium
Enterobacteriaceae	Methylococcaceae	Vibrio
Buchnera	Methylococcus	

Calymmatobacterium	Methylomonas	Xanthomonadaceae
Citrobacter		Lysobacter
Cronobacter	Moraxellaceae	Stenotrophomonas
Edwardsiella	Acinetobacter	Xanthomonas
Enterobacter	Moraxella	Xylella

#### 1.4.1.4. Deltaproteobacteria

Es un grupo del filo proteo-bacteria representado por una diversidad morfológica y sulfidogenos aeróbicos. Algunos de los miembros de este grupo son considerados predadores de bacterias ya que presentan propiedades bacteriolíticas. Algunos de estos ejemplos tenemos los Myxococcus, Geobacter y Desulfovibrio.

**Tabla 4** Algunos géneros y familias del grupo delta-proteobacteria, (los géneros con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.)

<b>Deltaproteobacteria</b>	
	Bdellovibrio
	Bilophila
	Desulfovibrio
	Desulfovibrio africanus
	Desulfovibrio desulfuricans
	Desulfovibrio gigas
	Desulfovibrio vulgaris

Desulfuromonas

Geobacter

Lawsonia Bacteria

Myxococcales

Myxococcus

Stigmatella

---

#### 1.4.1.5. Epsilonproteobacteria

Es un grupo de proteobacteria que consisten en chemoorganotrophicos usualmente asociados con el sistema Digestivo de humanos y animales. Entre ellas se encuentra el género Helicobacter, Campylobacter, Arcobacter y Wolinella.

**Tabla 5** Algunos géneros y familias del grupo epsilon-proteobacteria, (los géneros con sangría) Extraído de (National Center for Biotechnology et al., n.d.)

---

<b>Epsilonproteobacteria</b>
Arcobacter
Campylobacter
Campylobacter coli

Campylobacter fetus  
Campylobacter hyointestinalis  
Campylobacter jejuni  
Campylobacter lari  
Campylobacter rectus  
Campylobacter sputorum  
Campylobacter upsaliensis

Helicobacter

Helicobacter felis  
Helicobacter heilmannii  
Helicobacter hepaticus  
Helicobacter mustelae  
Helicobacter pylori

Wolinella

---

## 1.5. PATÓGENOS MÁS COMUNES EN BIVALVOS

Los principales patógenos en la acuicultura de moluscos son un grupo de las gamaproteobacteria perteneciente a la familia de los Vibrios, como *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los mencionan ciertos estudios enfocados en el cultivo de la ostra y abalón (Faury et al., 2004; Froelich and Oliver, 2013). Con respecto a la familia arciidae, se ha descrito que cepas de *V. parahaemoliticus* han sido un patógeno potencial en países asiáticos en cultivos de *Anadara granosa* (Sahilah et al., 2014; Yingkajorn et al., 2014). Incluso *V. Parahaemolíticus* ha llegado a ser descrito como pandemia llegando a afectar a dos especies de cultivo muy aparte de *A. granosa*, (*Meretrix meretrix*, *Perna viridis*)(Vuddhakul et al., 2006). Con respecto a *A. Tuberculosa* no hay datos en NCBI.

Los factores de patogenicidad y virulencia que presentan las bacterias se deben a pequeños genes que producen enzimas como proteasas, hemolisinas, metalo-proteasas, enterotoxinas, citotoxinas, sideroporos, factores adhesivos, y hemaglutina, entre otros. Estas enzimas son capaces de llevar a cabo la destrucción del tejido hemolinfático llegando a ser uno de los más peligrosos. (Shinoda, 2005)

### 1.5.1. Factores patógenos en Vibrios.

El género *Vibrio* es uno de las bacterias más conocidas gracias a su capacidad de producir enfermedades en acuicultura. (Shinoda and Miyoshi, 2011) Como el *V. parahaemolyticus* que produce la proteasa inducida por el gen PrtV-VppC que expresa una especie de colagenasa celular primaria de unos 50kDa. (Miyoshi et al., 2008). El mismo gen (PrtVp) se ha encontrado en *V. mimicus* siendo una pequeña variación con una función proteasa similar a la hemolisina. (Mizuno et al., 2014).

Por otra parte la Metallo-proteasa llamada Vibriolysin es otra de las proteasas que se pueden encontrar en *V. cholerae* y *V. proteolyticus*. (Iqbal et al., 2011; Sonoda et al., 2009). *V. vulnificus* es otro patógeno en potencia, presenta su propia proteasa extracelular de serina del gen VVP. (Miyoshi et al., 2012). Por último la proteasa hemoglutinina (HA/P) cual tiene propiedades recombinantes es propia de una cepa de *V. Cholerae*. (Sayamov et al., 2012).



### **1.5.2. Factores patógenos en Pseudomonas.**

Este género de bacteria también se lo conoce por su capacidad de producir enfermedades en acuicultura. Cepas de *Pseudomonas aureginosa* son consideradas como un importante factor de virulencia, presentan proteasas y enzimas dañinas capaces de causar patogenicidad como la elastasa A y elastasa B (LasA y LasB) y proteasas alcalina (aprA) (Caballero et al., 2001; Oǐdak and Trafny, 2005). Por otro lado la producción de varios tipos de hemolisina que es otro factor patógeno en la misma especie de bacteria que ha sido investigada. (Berk, 1962; Johnson and Boese-Marrazzo, 1980).

### **1.5.3. Factores patógenos en Aeromonas.**

Un factor de virulencia concurrente de las aeromonas patógenas son las hemolisinas y las aerolisinas que tienen características citotóxicas. Ciertas cepas de *Aeromonas hydrophila* y *A. veronii* presentan genes *ahhl* y *asal* con una frecuencias del 36%-8.5% respectivamente. (Epple et al., 2004; Wang et al., 2003). Otro de los genes de virulencia referenciado es *aero* y *hlyA* empleados en un estudio de detección de genes de aerolisina y hemolisina en aeromonas aisladas de muestras ambientales y de peces. (Yousr et al., 2007).

#### **1.5.4. Septicemia**

Del griego “septos” que significa podredumbre, y alternativamente llamado “Toxemia o sepsis”. Es la presencia de crecimiento de organismos procariotas en la sangre y hemolinfa que muy a menudo forma infecciones graves.

Otro concepto parecido es la “Bacteremia” que solo es el conjunto de bacterias en la sangre sin contar si existe infección o no. (“MedlinePlus en español,” n.d.) Por otra parte, en organismos invertebrados, es natural encontrar flora bacteriana en sistemas linfáticos, y el más reciente concepto de Hologenoma ha hecho que aquellos conceptos vayan quedando obsoletos. (Brucker and Bordenstein, 2013; Carlet et al., 2008; Schefold et al., 2008).

## **1.6. PRINCIPIOS ACTIVOS EXTRACELULAR**

Los contenidos extracelulares de bacterias han sido continuamente estudiados. Se lo puede definir como “La parte externa de un organismo celular” o “Matriz extracelular”. Desde la invención de la clonación de plásmidos se ha dado importancia a esta actividad como fábricas de proteínas.

Los productos extracelulares (ECP's) en su composición comprenden metabolitos, iones, varias proteínas y sustancias no proteicas. Muchas de los ECP's de bacterias son sustancias tóxicas y patógenas considerados factores de virulencia.

### **1.6.1. Péptidos antimicrobianos de origen invertebrado**

El aislamiento de péptidos antimicrobianos está siendo estudiado actualmente, como la C-Lectina del camarón, y otros péptidos encontrados en la hemolinfa de varios invertebrados que tienen la propiedad de inhibir o controlar la microbiota bacteriana (Wang et al., 2014). Sin embargo estudios recientes se han enfocado en sustancias extracelulares, como el caso de

algunas *Pseudomonas* y pseudoalteromonas que han aislado el principio activo de varias proteínas bacteriostáticas.

### **1.6.2. Péptidos antimicrobianos de origen procariota**

Bacteriocin, es una proteína aislada de cepas de *Aeromonas media* que presenta actividad antagónica con varias cepas patógenas de acuicultura (Gibson, 1998). Así como la purificación de sustancias extracelulares de especies pseudoalteromonas, como la proteína P-153 (Longeon et al., 2004).

## 1.7. ACCIÓN PROBIÓTICO

La función de bacterias simbiotes en el hospedador se limita a complementariedad al sistema digestivo, protección contra infecciones locales, Inmunomodulación y efectos metabólicos. (Qi et al., 2009; Singh et al., 2013). Los usados en bivalvos, son en su mayoría de efectos metabólicos y antagonistas competentes en el sistema digestivo. (Aranda et al., 2012; Campa-Córdova et al., 2011; Gibson, 1998; Karim et al., 2013; Longeon et al., 2004; Martinez Cruz et al., 2012; Prado et al., 2010; Sahu et al., 2008).

Escasamente existen estudios de probióticos inmuno-moduladores y de protección contra infecciones locales estudiados en la hemolinfa. Los pocos trabajos que describen la flora bacteriana como potencial probiótico y como hologenoma en bivalvos solo involucran bacterias cultivables (Defer et al., 2013; Desriac et al., 2014; Mukherjee et al., 2014). Las bacterias no cultivables, pueden comprender un 90-99% de las poblaciones microbianas existentes como simbiotes de un hospedador invertebrado.

### **1.7.1. Tratamientos de probióticos en bivalvos**

Normalmente los tratamientos de probióticos en bivalvos se han aislado de partes del manto y sistema digestivo con el fin de usarlos diluido en el agua o en alimentación junto a un cultivo de algas (Aranda et al., 2012; Campa-Córdova et al., 2011; Gibson, 1998; Prado et al., 2010; Sahu et al., 2008).

Estudios realizados de infección y colonización de cepas de *Vibrio* a partir de un medio líquido infectado al bivalvo, La cohabitación de ambos demuestra que 1 a 6 primeras horas de exposición es suficiente para la colonización total de la hemolinfa del molusco (Cardinaud et al., 2014).

Mientras tanto la existencia de dos proteínas bactericidal permeability-increasing/lipopolysaccharide-binding, son una constitutiva e inducible proteína de fase acuosa contribuyente a la defensa inmune contra el hospedador contra infecciones de bacterias Gram-negativas en conchas arcas, de la familia arciidae (Mao et al., 2013). Propuesto este estudio, se cree que individuos que tienen una simbiosis con flora bacteriana diversa y abundante, que posiblemente la puedan perder al estar en un medio inocuo.

### **1.7.2. Uso de probióticos en bivalvos**

Los brotes de enfermedades en larvicultura de bivalvos causados por bacterias patógenas son frecuentes. Existen varias investigaciones que describen esos brotes, pero unos pocos que hablan sobre el control de esa microbiota (Prado et al., 2010).

El uso de probióticos en larvicultura de bivalvos es una alternativa válida ante el uso de antibióticos. Trabajos de Campa-Córdova et al, (2011) demuestran que probióticos aislados de ciertos bivalvos y camarón, pueden tener efecto positivo en la supervivencia de larvas de *Crassostrea Cortezensis*, a densidades de  $10^4$ CFU/mL.

Probióticos aislados de partes internas del manto y sistema digestivo, ha revelado que presentan actividad antagonista, junto a ella bacteriostática, como bacterias del género *proteobacter* que generan compuestos como el ácido tropodithietico que es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Karim et al., 2013; Prado et al., 2010). Similarmente, algunas cepas de *Pseudoalteromonas* sp. que presentan actividad bacteriostática

contra el *Vibrio parahemolyticus* aislado del bivalvo *Permytilus purpuratus* fue estudiada (Aranda et al., 2012).

## **1.8. METAGENÓMICA**

La metagenómica más allá del estudio genómico de un solo organismo, analiza las colecciones de secuencias obtenidas de muestras microbianas ambientales. Las ventajas de esta tecnología permiten estudiar la mayoría de microbios que no se pueden estudiar en laboratorios. Se puede realizar estudios de comunidades microbianas. Nos permite amplificar grandes secuencias de ADN a un bajo coste.

En el concepto de técnica metagenómica existen variantes como lo son: Metagenómica dirigida, metagenómica total, y metagenómica funcional. La metagenómica funcional es una técnica por medio de PRIMER's universales para mRNA funcional, siendo usado para el estudio de transcriptómica individual o un pool de ADN de varios organismos. La metagenómica total usa un solo genoma completo junto con un splicing de varios cortes al azar para la secuenciación individual por el posterior ensamblado de secuencias para armar el genoma completo. La metagenómica dirigida en taxonomía e identificación se basa en un gen de



referencia taxonómica como el ITS, 28S, 18S en hongos y 16SrRNA en organismos procariotas.

### **1.8.1. Genes de referencia taxonómica en procariotas**

Los genes de referencia taxonómica mayormente usados son los genes mitocondriales. En el caso de bacterias los genes de referencia son el 5SrRNA; 16SrRNA y 23SrRNA con ciertas excepciones. Actualmente existen en la base de datos NCBI alrededor de 8 570 078 resultados de secuencias referenciadas con el gen del ribosoma 16S. Respecto con el gen 23S, se evidencia unos 3 418 485 resultados de secuencias y por último el 5S tiene 3 003 680 secuencias. Siendo el 16S uno de los genes con mayor número de publicaciones y el mejor candidato para realizar una taxonomía molecular de bacterias.

#### **1.8.1.1. 16SrRNA**

La pequeña Subunidad del ribosoma 16S es un componente del 30S que radica en 1542 nucleótidos, donde el 46% de estos se encuentran apareados entre ellos conformados con RNA y proteínas. Este gen se

encuentra altamente preservado en organismos procariotas ya que su mutación constante provocaría un mal funcionamiento del ribosoma y por ende no produciría proteínas causando la muerte celular. (Rosselló-Mora, 2005). Este gen es muy usado en la reconstrucción de filogenias debido a los bajos niveles de evolución que presenta.

### **1.8.2. Metagenómica dirigida al gen 16SrRNA**

Muchos son los trabajos realizados a nivel de identificación molecular de microorganismos que parte desde muestras de suelo y agua hasta la microbiota bacteriana como parte del hologenoma de un holobionte. Los principales estudios que se enfocan a la metagenómica bacteriana dirigida al 16SrDNA como marcador taxonómico se basan en estudios descriptivos y ecológicos de poblaciones y dinámica bacteriana en el medio ambiente, en muestras de agua y suelos (Bruce Rodrigues, 2011; Gilbert et al., 2012).

Varios estudios se han enfocado en bacterias simbiotes como comunidades y microbiomas. (Wu et al., 2010) Los ejemplares hospedadores más estudiados son los corales y otros invertebrados primitivos como esponjas que su existencia depende netamente de enzimas y productos extracelulares de bacterias y algas (Cavalcanti et al.,

2014). Con respecto a moluscos, se ha reportado un trabajo donde comparan bacterias del tejido muscular de opistobranquios simbioses de algas, llegando a un total de 1574 OTU's (Devine et al., 2012a).

### **1.9. NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)**

Hoy en día existen tecnologías que permiten secuenciar todo el genoma de los organismos en poco tiempo y costo. Las tecnologías NGS (Next Generation Sequencing) nos permiten hacer una metagenómica dirigida a un gen en particular. El 16SrDNA es el más estudiado en referencia a taxonomía bacteriana. Entre ellos están el 454 Roche, Pirosecuenciación e Illumina.

La plataforma NGS permite una amplia variedad de métodos, permitiendo a los investigadores pedir cualquier servicio relacionado con el genoma, transcriptoma, o epigenoma de cualquier organismo. Con la facilidad de usos de kits de extracción de DNA preparados para cada tipo de requerimiento, todo el genoma o regiones específicas. Las opciones del análisis vienen con facilidades de elección de librerías y bibliotecas de secuencias.

### 1.9.1. ION TORRENT Pirosecuenciación

Next generation sequencing (NGS) utiliza la secuenciación masiva en paralelo para generar miles de megabases de secuencia de la información por día, abriendo las puertas a nuevos estudios de investigación que antes eran difíciles de lograr de una manera práctica. Desarrollado por chips semiconductores, tecnología de secuenciación Ion Torrent <sup>TM</sup> es más simple, más rápido y más rentable y escalable que otras tecnologías de secuenciación de sobremesa de nueva generación. Experimente la velocidad, escalabilidad y sencillez de secuenciación Ion Torrent <sup>TM</sup>.

Por otro lado la calidad de las secuencias no promete ser de buena longitud. Por lo que el problema radica en la longitud de lectura para la identificación en la base de datos.

## 1.10. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Actualmente existen varias técnicas y kits ya preparados que dependen del tipo de muestreo que se irá a usar. Los tipos de muestras más comunes en metagenómica son el agua y el suelo. (Purohit and Singh, 2009; Vo and Jedlicka, 2014) Sin embargo, por su baja demanda, no existen kits de extracción de DNA de bacterias de hemolinfa de animales invertebrados.

Los pocos protocolos que existen son solo de extracción de DNA de bacterias de hemolinfa. El protocolo más cercano que se ha encontrado es un método sensitivo y universal para aislar ADN microbiano a partir de productos de sangre. (Golbang et al., 1996) Una adaptación de la técnica es viable para la extracción de ADN de microorganismos en la hemolinfa de invertebrados por el motivo que se usa sangre completa en el proceso.

Respecto a los protocolos de extracción de ADN de contenido estomacal, existen varias metodologías y kits siendo muy usual en análisis metagenómica. Un estudio sugiere que el uso de kits comerciales son ineficientes en el coste y tiempo de extracción de ADN metagenómico en

contenido intestinal. Por lo que el uso de métodos tradicionales como extracción por ebullición podrían dar los mismos resultados. (Peng et al., 2013).

Existen dos métodos tradicionales como el SBS y el CTAB que son eficientes respecto al coste. El método SBS consiste en los mismos procesos para la extracción de ADN común y corriente. Consiste en la lisis celular por ebullición usando como reagente el SBS. De igual manera el CTAB funciona de la misma manera con ciertos cambios en los procesos en el tiempo y temperatura de ebullición.

### **1.11. MANEJO DE DATOS DE METAGENÓMICA**

Los archivos más comunes que arroja el ION TORRENT sequencing son los archivos formato fasta y qual siendo independientes para cada muestreo y que dependerá de la cantidad de información y número de OTU's (Operational Taxonomic Units) el peso de la información variará. Las secuencias de ADN se encuentran en formato de nucleótidos como A, G, C y T.

El siguiente paso para unión de las secuencias son el alineado y agrupado en un solo archivo, en este caso se puede usar el algoritmo ClustalW. Otra de las alternativas disponibles para el manejo de datos son las páginas web para el análisis y manejo de información bioinformática. (Sharpton, 2014).

El control de calidad de las secuencias es indispensable a la hora de hacer un análisis o una búsqueda comparativa en las librerías de metagenómica. Existen herramientas que se encargan de eliminar errores de secuenciación al correr un análisis.

En el manejo de datos pueden existir tres opciones dependiendo de la longitud de ADN y perfil del objetivo. Puede haber un análisis directo de marcadores de genes, que realiza una comparación de metadatos online y el producto final es la identificación de OTU's e identificación filogenética. El Binning, es una técnica de pre-proceso usada para reducir los efectos de menor observación de errores. Assembly es una técnica de ensamblado de DNA cortado por enzimas de restricción, normalmente se usa para unir las y obtener un perfil completo de un ADN de un organismo en particular.

Por último, la metagenómica comparativa se usa en especial cuando se trabaja con taxonomía de organismos en este caso con el gen 16SrRNA de bacterias. Los análisis más comunes en la metagenómica comparativa es la similaridad inter-comunidad, correlación de metadata y detección de biomarcadores, etc.

### **1.11.1. MG-RAST**

MG-RAST es una base de datos en línea para el análisis de secuencias de metagenómica. Se encuentra en la página web: <http://metagenomics.anl.gov>. La base de datos cuenta con herramientas



para la tabulación de taxones, análisis de OTU's, y un análisis de funciones.  
(Elizabeth M Glass, 2010).

#### **1.11.1.1. Ingreso de datos.**

Una vez creado un usuario, se crea un proyecto llenando un formulario. Posteriormente se suben los archivos FASTA (fsa) a la base de datos. Por último, se los busca y selecciona para el análisis. Los metagenomas fácilmente se seleccionan con el código de accesoión o ID.

##### **1.11.1.1.1. Preprocessing**

Es un pre-procesado de muestras donde se filtran las secuencias que presentan poca longitud, número de bases ambiguas y redundantes, y secuencias con pésima calidad. Por lo que los archivos FASTA se tendrán que formatear repetidas veces. Se generaron dos archivos, las secuencias que pasaron y las que fueron removidas. Los archivos de salida tienden a llamarse "100.preprocess.passed.fna" y "100.preprocess.removed.fna".

#### **1.11.1.1.2. Dereplication**

En la De-replicación escoge secuencias que no presentan redundancia. Se remueven secuencias que presentan las 50 primeras pares de bases idénticas. El archivo de entrada es el archivo que pasó el test en el pre-proceso. Así mismo se crearon dos archivos, el que pasa el test y el que no. Los archivos que se crean este análisis tienden a llamarse “150.dereplication.passed.fna” y “150.dereplication.removed.fna”.

#### **1.11.1.1.3. Screening**

Se introdujeron archivos del proceso anterior, en el mismo formato. El screening crea un formato Fasta conteniendo las secuencia que se conservaron y pasarán a la siguiente etapa del análisis. El archivo que arroja el análisis tiende a llamarse “299.screen.passed.fna”

#### **1.11.1.1.4. Gene calling**

El archivo de entrada de este paso es del análisis anterior. Gene calling muestra una vista previa del estado de las secuencias. Codifica regiones con las secuencias usando FragGeneScan, que es un algoritmo ab-initio gene calling para procariotas. Usando un modelo oculto de Markov, identifica los vínculos entre marco de lectura y secuencias de nucleótidos traducidos en secuencias de aminoácidos. El archivo de salida tiende a llamarse “350.genecalling.coding.faa” que contiene regiones cofificantes predecidas.

#### **1.11.1.1.5. RNA Identification**

El archivo de entrada son los datos que pasaron la prueba del pre-procesado .Este análisis realiza un UCLUST mediante QIIME-Soft usando un 70% de identidad para secuencias ribosomales siguiendo la base de datos de RNA. Los archivos de salida tienden a llamarse “425.search.rna.fna”.

#### **1.11.1.1.6. RNA Clustering 97%**

El archivo de secuencia de ingreso es del análisis anterior “425.search.rna.fna” Se calcula un clúster al 97% de identidad mediante un qiime-uclust, las secuencias no son eliminadas ni removidas durante el proceso. Después de la búsqueda, los datos se cargan en MG-RAST para el análisis de datos de metagenómica. Los archivos de salida son “440.cluster.rna97.fsa” que contienen secuencias agrupadas con un 97% de identidad y “440.cluster.rna97.mapping” que contiene datos de la matriz de datos del clúster.

#### **1.11.1.1.7. M5 RNA Search**

En este proceso se requiere los archivos del clúster anterior “440.cluster.rna97.fsa”. Este paso da una asignación taxonómica a cada secuencia. La similaridad del BLAT contra la base de datos de RNA es el archivo “450.rna.sims” que se encuentra en formato m8 de BLAST. Como así también se crea un identificador de consulta (ID) que es la asignación e identificación de la base de datos creada para el acceso online junto a ello demás datos de procesado, clustering, longitud de alineamiento, porcentaje de identidad entre otros son mostrados.

#### **1.11.1.1.8. Protein Clustering 90%**

El archivo de secuencia de ingreso es el archivo "350.genecalling.coding.faa". Secuencias que codifican proteínas son identificadas con FragGeneScan se agrupan en un 90% de identidad con quiime-clust. Después de este proceso se cargan en MG-RAST para su respectivo análisis. Los archivos de salida son "550.cluster.aa90.faa2" que contiene las traducciones de una secuencia de cada grupo y el archivo "550.cluster.aa90.mapping" que son tabulaciones que identifica los grupos de secuencias.

#### **1.11.1.1.9. M5 Protein Search**

El archivo de entrada es "550.cluster.aa90.faa" del análisis anterior. La similaridad del BLAT contra la base de datos de RNA es el archivo "650.superblat.sims" que se encuentra en formato m8 de BLAST, esto incluye el identificador del análisis y el número de acceso de consulta así como otros datos de clustering, porcentaje de identidad, longitud de alineamiento, gaps, e-value, entre otros.

### 1.11.1.2. Procesado de datos en MG-RAST

Existen dos tipos de análisis: comparación individual y comparación por grupos. La comparación por grupos se realiza para discernir dos o más microbiomas cuando se creen que son distintos. Mientras que el individual se puede seleccionar varios metagenomas comparados entre sí. La página *overview* muestra un resumen del metagenoma donde especifica el nombre, número de pares de bases, número de secuencias y sus estadísticas generales. Otros datos que muestra son las coordenadas, el hábitat asociado, un histograma de los nucleótidos presentes, y varias gráficas de la distribución de grupos taxonómicos. La densidad alfa o biodiversidad e histogramas de pedazos de secuencias.

La elección de la base de datos es un paso importante a la hora de hacer una búsqueda metagenómica. Uno de ellos es el M5NR es un recurso de búsqueda que tiene metadatos de ADN y proteínas. Compartiendo base de datos con GO, SILVA, KEGG, tiene la ventaja de tener un mayor acaparamiento y cobertura de identificación de secuencias. PATRIC en cambio es un sistema de información para conseguir datos de Genbank que se enfoca en secuencias de patógenos. IMG - Integrated Microbial

Genomes en sus siglas en inglés, es una base de datos que contiene metadatos de genomas y metagenomas procariotas en su mayoría.

La programación de parámetros de búsqueda consiste en elegir los valores determinados al tipo de investigación. El parámetro de corte e-value es designado a la probabilidad del tamaño de muestra más cercano logrando ser de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-9}$ . El corte de identidad, es un valor de 1 a 100% que programa el nivel de identificación de secuencia de las especies del metagenoma. Los valores de 90-95% sirven para discernir a nivel de género, mientras que el 95-97% puede discernir entre especies. El corte de lineamiento es un dato promedio del número de pares de bases, un total de 500bp dan un valor de 15 para el análisis. Los algoritmos de cálculos se encuentran en el artículo postulado por Kent, (2002).

#### **1.11.1.3. Tabla de filogenia de metagenomas**

Es una tabla generalizada que contiene opciones de filtros para cada sección con una interface fácil e interactiva. Los encabezados de la tabla muestra el número de accesión del metagenoma, la base de datos donde fue obtenida, el dominio, el filo, la clase, y abundancia e inclusive hay

opciones para mostrar más ramas de la taxonomía e inclusive géneros y especies. También existen opciones para exportarla en formato tsv-file.

Existen *plugins* para la el graficado de árboles filogenéticos interactivos con la función de colapsar por los diferentes niveles de taxones. Estos árboles son desarrollados por Krona y Qiime que son programas bioinformáticos en línea. La función de descarga de metadatos para cada uno de los softwares también está disponible.

#### **1.11.1.4. Barchart**

Es un gráfico de barras horizontales que nos da información de proporciones estimadas de taxones pertenecientes a cada dominio. Seguido de su interactividad, se puede desglosar por cada dominio, a su vez por cada phylum, y así sucesivamente hasta poder llegar a la especie.

En configuraciones de uso de datos presenta dos opciones, Raw y normalizar. Normalizar permite que los datos balanceen las contribuciones relativas de las secuencias al total hecho para elaborar el heatmap.



Mientras que el uso de datos crudos no pasan por un pretratamiento de datos, por lo tanto los datos se presentan exagerados.

#### **1.11.1.5. Phylogeny circular tree**

Es un árbol filogenético de MG-RAST que genera clados circulares para abarcar eficientemente el espacio. En las opciones está la configuración de los colores de cada taxón, la opción *leaf weights* que genera barras apiladas mostrando las proporciones de secuencias o ampliaciones de cada muestra. La parte interactiva se presenta al seleccionar los nodos, que nos arroja información acerca de cuántos hits de las secuencias de cada metagenoma correspondieron para hacer la clasificación en ese nodo y cómo se subdivide en grupos.

#### **1.11.1.6. Heatmap**

Es un gráfico de coloración que genera y organiza información a nivel taxonómico, de cepa a dominio versus bioma. Una de sus características es que da la opción de usar valores normalizados o valores crudos con diferentes métodos de clustering y distancias.

El heatmap está compuesto por dos árboles, uno horizontal y otro vertical. El horizontal muestra las agrupaciones filogenéticas de las diferentes tipos de especies identificadas. El árbol vertical nos presenta el nivel de similitud de los diferentes biomas estudiados. El tamaño de las secuencias de cada muestra de acuerdo al nivel taxonómico se observa en un gráfico de cajas y bigotes

Los métodos de clustering agrupan objetos de un conjunto de acuerdo a la similitud de sus características. Se utiliza matriz de distancias como datos de ingreso. Los tipos de cálculos que incluyen son Ward, single, complete, Mcquitty, median y centroid. Single clustering se basa en hacer pares repetitivos de elementos parecidos y comparar a su vez con otros. Clustering Ward calcula la suma de cuadrados de observaciones. Clustering complete se basa en el valor de la máxima diferencia de algunas de las observaciones de las dos muestras. Clustering centroid saca la distancia euclideana de los centroides o medias de grupos de datos.

Los de cálculos de distancias muestran el parecido de dos observaciones de acuerdo a diferentes factores. Los tipos de distancias son el Bray-Curtis, Euclidean, Maximum, Manhattan, Canberra, minkowski y difference. El

método Bray-Curtis, es un índice que se basa en comparar observaciones de casos compartidos. La distancia euclidiana y máxima son métodos de distancia que comparan objetos por su posición en el espacio n-dimensional de características ajenas.

#### **1.11.1.7. PCoA**

Es un análisis de coordenadas principales que en sus siglas en inglés (Principal Coordinates of Analysis) también llamado re escalamiento multidimensional clásico. Es un método multivariado para explorar similitudes en conjunto de datos.

El PCoA se basa en analizar los eigenvectores o ejes que resumen la variación. El gráfico permite explorar y visualizar las diferencias de un conjunto de datos.

#### **1.11.1.8. Rarefaction**

Es una gráfica usada en análisis de secuencias y OTU's donde permite comparar la diversidad alfa de una muestra o bioma. La diversidad alfa es

el número de especies locales y se calcula mediante el índice de Shannon.

Esta gráfica también es usada para observar la calidad de las muestras.

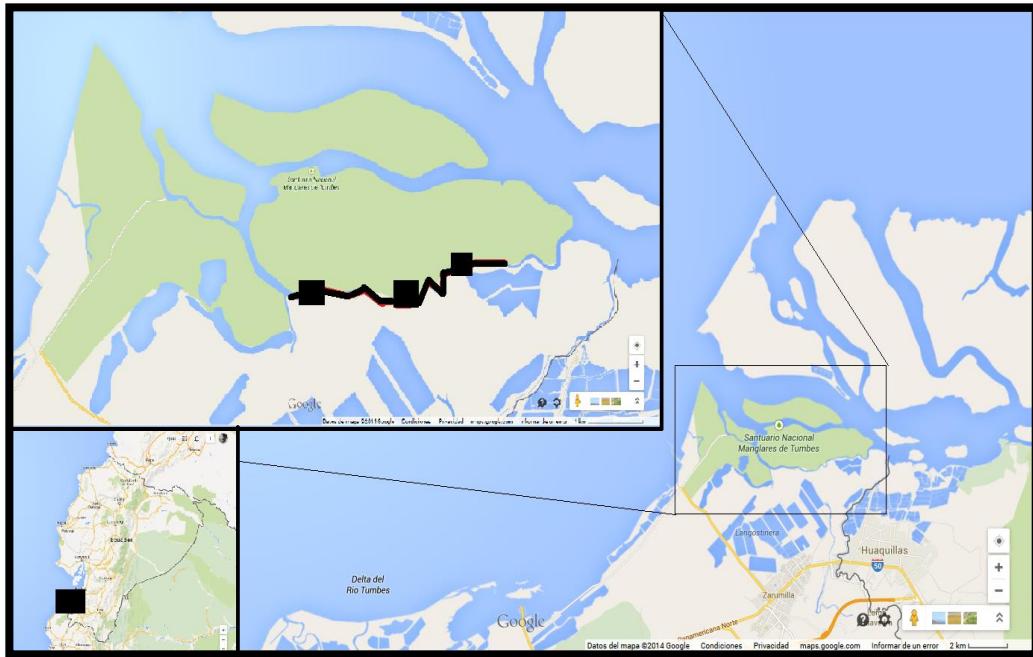
## **CAPÍTULO 2**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRA**

##### **2.1.1. Lugar de estudio**

Los ejemplares de concha negra fueron obtenidos del medio natural en El Santuario Nacional de los manglares de Tumbes ubicado al Norte de Perú, Coordenadas 3.396096S,-80.38154W. El lugar cuenta con unas 2972Has de bosque manglar protegido. Se encuentra en el departamento de Tumbes, en la provincia de Zarumilla. Presenta un hábitat bosque seco tropical y bosque tropical del pacífico. Su flora manglar luce los cuatro ejemplares de mangle pacífico sudamericano siendo el hábitat apropiado y uno de los últimos en latitud sur.



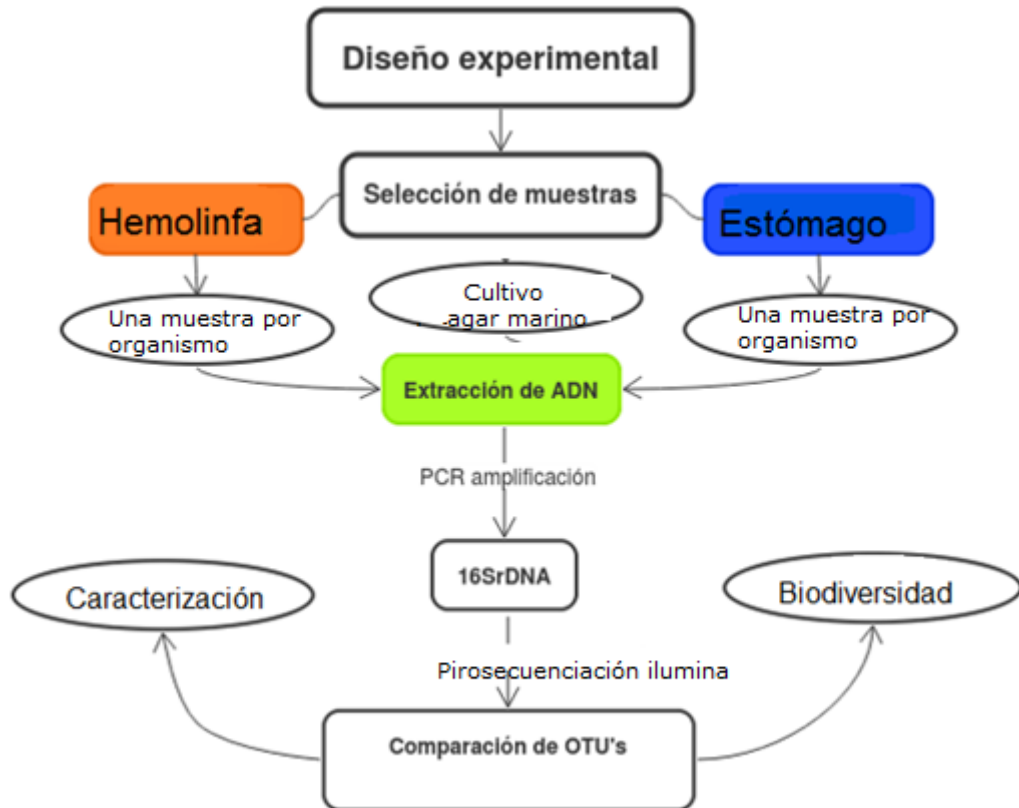
**Ilustración 4** Área de estudio donde se extrajeron los organismos de *A. tuberculosa*. FUENTE: googlemaps.

### 2.1.2. Muestreo

El muestreo se realizó en una de las zonas con el menor impacto antrópico. En la recolección de organismos se guió de la experiencia de los concheros de la zona abarcando una longitud de 900m con tres transeptos de 300m. Los parámetros de muestreo se situaron en los niveles normales de con una salinidad de 20 a 35ppt, pH8.0, temperatura de 25°C, día nublado. Se logró extraer 30 ejemplares de Concha negra *A. tuberculosa* excluyendo

especies parecidas como *A. similis*. Los bivalvos fueron trasladados en temperatura ambiente y en seco al laboratorio de la empresa de biotecnología Inca Biotec S.A.

## 2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL



**Ilustración 5** Diseño experimental de la metagenómica de bacterias asociadas a la hemoglobina e intestino de *Anadara tuberculosa*



### 2.3. MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS

**Tabla 6** Materiales y equipos e insumos de la actividad experimental.

	<b>Descripción</b>	<b>Justificación</b>
Insumos	Puntas Micropipetas	Necesarias para extracción de DNA y PCR
	100 Jeringa 1mL	Extracción de Hemoglobina
	1 Hielera de 36000cc	Preservación de muestras
	DNA Extraction Kit ®	Extracción de ADN
	1 Paquete de guantes	Preservar la asepsia del proceso
	Primers: 1492R y 27F	Cebadores de amplificación 16SrDNA
	Master Mix Taq Pol	Polimerasa usada para la amplificación de Fragmentos de DNA
	PCR Purification Kit	Purificación de DNA para la secuenciación
	Placas de microscopio	-
	Agarosa gel	Comprobación mediante Electroforesis
equipos	Microscopio	Para seleccionar muestras de hemocitos
	Cámara microscopio	Evidencia
	Cámara digital	Evidencia
	Lámpara electroforesis	Comprobante
	Centrífuga de frio	-
	Termociclador	Amplificar ADN
	Micro pipetas	10uL, 50uL, 200uL, 1000uL
	Baño maría	Extracción ADN
	Vortex	

## **2.4. AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN AGAR MARINO**

Se aislaron microorganismos de muestras de estómago y hemoglobina de Concha negra ajena a las muestras que se utilizarán para metagenómica, mediante la utilización de agar marino al 0.25% de NaCl para siembra, el aislamiento por agotamiento y la selección de morfología de la colonia y la bacteria mediante microscopía de tinciones Gram.

## **2.5. EXTRACCIÓN DE LA HEMOGLOBINA & TRACTO DIGESTIVO**

Se seleccionaron organismos sanos según la forma y disposición de hemocitos. Se aseguró que estuvieran vivos antes de extraer la hemoglobina. Por lo general los hemocitos sanos son abundantes en la hemoglobina de bivalvos, estando enfermos, la forma y disposición de hemocitos es irregular y baja (Allam et al., 2000; Travers et al., 2014). Los organismos que no presentaban reflejos al pinchar el músculo aductor eran considerados muertos.

Se extrajeron 0,5mL de hemoglobina de uno de los músculos aductores de tres ejemplares de *A. tuberculosa* de (>45mm) (Novitskaya and Soldatov,

2013) (*Bivalve Anatomy (freshwater mussel)*, 2012). Se realizó una muestra por cada ejemplar y se sometió directamente a la extracción de DNA y purificación y cuantificación de amplicón para aliquotar a una concentración específica de 100µg/µl.

Para las muestras de estómago se sacrificaron organismos tomándose las mismas indicaciones de selección. Se recuperó la masa visceral y se colocó en un tubo eppendorf de 15ml junto con CA-latter, un preservante de ADN.

**Ilustración 33 e Ilustración 34.**

## 2.6. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de DNA total, se basó en una adaptación de la metodología tradicional de extracción de ADN por CTAB. Consiste en centrifugar la hemoglobina o intestino, obteniendo un pellet, donde se agrega 500µl de buffer de lisis compuesto de CTAB (Tris HCL 100mM, ClNa 1.4M, pH8.0, EDTA 20mM, CTAB 2%) mezclando con 2.ml de proteinasa-K. incubándose en un baño maría entre 2 horas a 55°C. Posteriormente un agregado de 1µl de RNAasa. (Pure link) por cada muestra incubando nuevamente a 55°C por 10min.

Después de agregar Fenol 300µl y cloroformo: alcohol isoamil, 24:1 300µl, se centrifugó a 5°C a 4 min por 13000rpm. La fase acuosa o sobrenadante se recuperó y se agregó unos 300µl de Cloroformo/ alcohol isoamil 24:1 repitiéndose el paso anterior. Se agregó etanol al 96% el doble de proporción del sobrenadante rescatado incubando a -20°C por 15min y centrifugando a 13000rpm por 10min a 5°C. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso con etanol al 75%. Después de la centrifugación, se eliminó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente. Se re-suspendió el ADN con 50ml de TE 1X previamente calentada a 65°C posteriormente conservándose a -20°C.

Para las cepas aisladas se realizó extracción de DNA mediante la lysis física por cambios drásticos de temperatura con constantes lavados de etanol al 95% y preservado en agua ultra pura.

## 2.7. PCR DEL GEN 16SRRNA

En metagenómica como en aislamientos de cepas, se amplificó la subunidad 16 del gen ribosomal (16SrRNA). El PCR se realizó con un termociclador marca biometra® y con los primers universales 27F y 1492R, (5´ AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3´) (5´ CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3´) (Andersson et al. 2008). Obteniéndose como producto un tamaño de fragmento de 1500 pares de bases. El programa de PCR se realizó con una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C a 6min con 35 ciclos de 94°C a 30sec, 68°C a 45sec, 72°C a 1min y por último una fase de hibridación final de 72°C a 4 min conservando el amplicón a 4°C por tiempo indefinido.. La mezcla de reactivos se lo realizará de acuerdo con (Devine et al., 2012b) donde 0,2mmol-1 de cada dNTP, 0,2 mmol-1 de cada primer, 0.0625U de taq polimerasa y 10ng de DNA. La mezcla de reactivos estuvo conformada de 2.5µl de buffer, 2.5µl de MgCl, 0.5µl de dNTPs, 0.1µl de Taq-Polimerasa. 16.2µl de AUP y 0.6µl de cada PRIMER. Este paso de PCR se lo realizará únicamente para comprobar si se extrajo ADN bacteriano y si se encuentra el gen 16SrRNA en la muestra obtenida.

## **2.8. PREPARACIÓN DE BIBLIOTECA IonTorrent™**

Se empleó un servicio de Pirosecuenciación enviándose 5 muestras de ADN mediante un kit de envío conjunto de 50 muestras. El servicio de secuenciación no requiere purificación del amplicón producto del PCR solo ADN completo purificado a 100ng en 50µl. Se prepararon las bibliotecas en base al ADN ribosomal para ello se enviaron también los PRIMER's del gen de interés (16SrRNA).

## **2.9. ENVÍO DE AMPLICÓN 16SRRNA A SECUENCIACIÓN SANGER**

Se prepararon los amplicones de 16S en tubos eppendorf a una concentración de 300µg/µl en 100µlml. Se entregó un paquete de 18 muestras enviándose con un periodo de espera de un mes.

## 2.10. ANÁLISIS DE DATOS

### 2.10.1. Pretratamiento de archivos Metagenómica

Para los archivos resultantes del secuenciador ION TORRENT se utilizaron varios softwares del sistema Operativo Biolinux 14.75 ®. Utilizándose QIIME 7.52 para desglosar los únicos archivos tipo fasta, qual y mapping que contenían los 100 metagenomas de muestreo que se habían enviado.

Para el Split de metagenomas se usó un terminal en el directorio de las secuencias que con el programa QIIME abierto se escribieron los siguientes comandos:

1: Decodificación de código de barra

```
split_libraries.py -m Mapping.txt -f file.fna -q file.qual -o  
split_Library_output_8bp/ -b 8
```

Los nombres en negrita son los archivos con las extensiones antes nombradas. Se crearán una base de datos en la carpeta output llamada



seqs.fna. Se sitúa en la carpeta de output en el directorio del terminal de Biolinix, se abre por segunda vez QIIME y se coloca el siguiente comando:

2: Creación de archivos separados por muestra metagenómica

```
split_fasta_on_sample_ids.py -i seqs.fna -o out/
```

Para finalizar se escogieron las muestras metagenómica de concha negra de estómago y hemoglobina y se procedió a analizarlas.

### **2.10.2. Alineamiento e identificación molecular**

Las secuencias producto del metagenoma fueron editadas y armadas en MG-RAST, fueron alineadas y mediante el algoritmo ClustalW bajo un bootstrap de 1000 repeticiones. Se eliminaron las secuencias que tengan menos de 150 bases. Las secuencias de DNA se compararon en línea mediante M5NR genbank usando algoritmo BLASTn bajo el 60% de identidad de secuencias mediante el método de identificación del ancestro común más bajo.

Por otra parte las secuencias de bacterias fueron alineadas en BIOEDIT mediante un CLUSTALW. Al mismo tiempo se eliminaron dos secuencias que presentaban error de lectura.

### 2.10.3. **Análisis filogenético de cepas aisladas**

Las secuencias de bacterias cultivadas fueron alineadas y se testearon por el jModelTest de JalView 3.0, para seleccionar el mejor modelo de sustitución de pares de bases. Seguido de la utilización del Máximium Likelihood en PhyML 4.3 basado en secuencias simples para la construcción de un árbol de filogenético. El árbol filogenético fue graficado mediante Archeopteryx 10.3.

### 2.10.4. **Comparación de comunidades metagenómica**

Se usó la plataforma MG-RAST para la comparación metagenómica de tres organismos estuarinos. Se trabajó con archivos de metagenomas de organismos como la Ostra *Crassostrea virginica* y el mejillón *Mitylus galloprovincialis*, datos extraídos de trabajos de King et al., (2012) y Craft

et al., (2010). Se revisaron Diversidades alpha y se realizaron comparaciones de proporciones de abundancia de especies por familia.

#### **2.10.5. Búsqueda en Base de datos NCBI**

Se realizaron búsquedas por especie y cepa resultante de la metagenómica por medio de la herramienta taxonomy de NCBI. Por medio de la tabla de base de datos se podía observar por microorganismo, información acerca de su cultivo en stock en instituciones internacionales para bacterias cultivables. Por otro lado se revisaba si existía información en la base de datos de PATRIC, que presenta registros de bacterias con antecedentes de patogenicidad.

## **CAPÍTULO 3**

### **3. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Se obtuvieron 6 muestras de Concha negra y fueron tratadas inmediatamente en laboratorio para la extracción de ADN de estómago y hemoglobina. Se realizaron los respectivos análisis de cuantificación de ADN y de amplificación del 16S por PCR. Las muestras que fueron aptas para enviar fueron CN.E1, CN.E3, CN.E4 para estómago y CN.H1M, CN.H3M para la hemoglobina respectivamente. Por otro lado fue posible aislar 28 cepas de bacterias que por medio de la secuenciación de 16SrRNA y su análisis en BLAST se identificaron 8 especies.

### 3.1. TESTEO DE MUESTRAS

#### 3.1.1. Calidad de Hemoglobina

Se extrajo hemoglobina para extracción de ADN y a su vez observación en microscopía. Se separó 10µl de muestra, como resultado no se observaron anomalías en la estructura y composición de hemocitos y células diferenciadas **Ilustración 7**



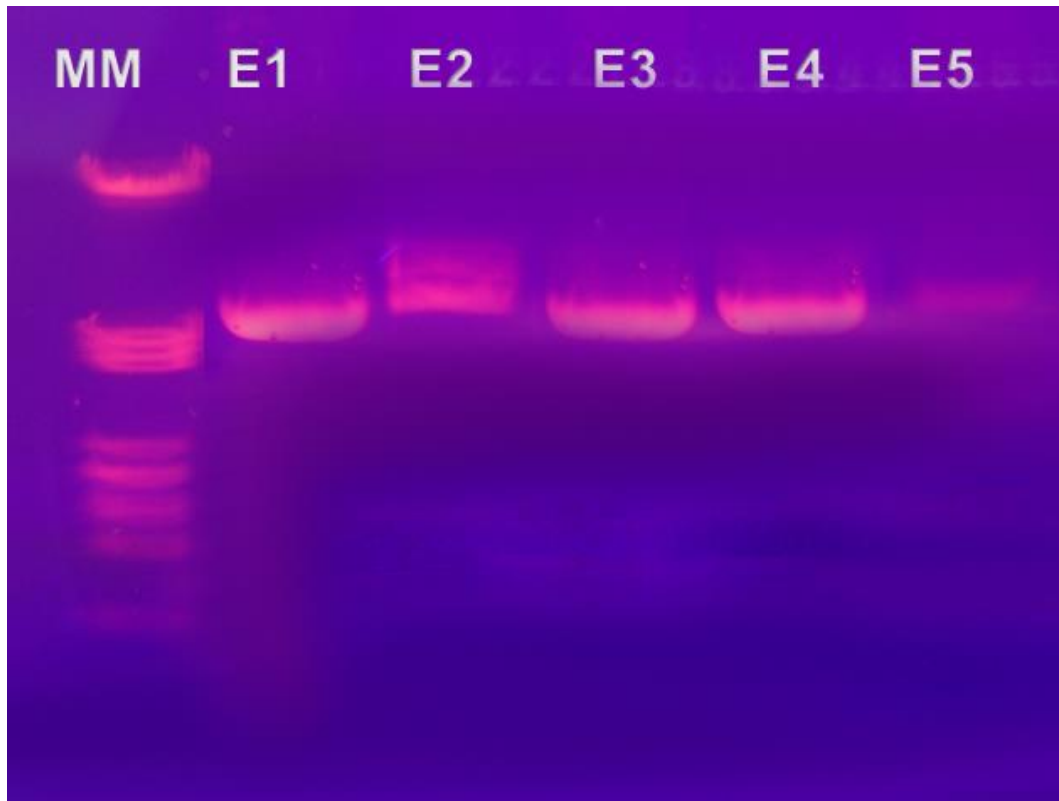
**Ilustración 6** Disposición y estructura de Células de la hemoglobina.



**Ilustración 7** Distribución de las células de hemocitos de la concha negra, fagocitos con la flecha negra.

### 3.1.2. Amplificación del 16SrRNA

Se extrajo ADN del estómago de seis organismos y se amplificó el 16S por PCR. Las muestras 3 y 4 dieron positivo fuerte y se seleccionaron para secuenciar como CN.E1 y CN.E2.



**Ilustración 8** Amplicón del gen 16S de bacterias de el contenido intestinal de la Concha negra. El amplicón presenta unas 1.5k pares de base.

Se seleccionaron tres muestras de estómago para la secuenciación. La mala calidad del amplicón podría deberse a e exceso de ADN en la PCR. Como consecuencia para evitar la perdida de gastos se la omitió.

### 3.1.3. Absorbancia de ADN

Se midieron la absorbancia de ADN de las muestras de estómago como de las de Hemoglobina. Todas las muestras mostraron una cantidad considerable de ADN genómico. Posteriormente se utilizó este dato para diluir el ADN y enviarlo a secuenciar en partes iguales y con la misma concentración.

**Tabla 7** Cuantificación de ADN con distintos niveles de absorbancia

<b>Muestra</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>A230</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>A320</b>	<b>µg/µl</b>
E1/C1	1.81	2.06	0.5	1.032	0.57	0.099	619
E2/C2	1.69	1.99	1.22	2.424	1.432	0.053	1455
E3/C3	1.7	2.29	0.853	1.951	1.024	0.096	1171



### 3.2. GENERALIDADES DE LA SUMISIÓN DE DATOS

Los archivos de metagenómica que llegaron eran un solo paquete de formato “fasta”, un archivo “qual” y un mapping.txt” que contenían las secuencias, datos de calidad y el mapeo de código de barras (*barcode*) de las muestras respectivamente. Las secuencias fueron desempaquetadas por muestras y se subieron a la plataforma MG-RAST. Se llenó el formulario de sumisión y se esperó el tratamiento de preprocesado y filtro. Los números de acceso de las secuencias en MG-RAST son 4636006.3, 4636007.3, 4636008.3, 4636009.3, 4636010.3 y el id del proyecto es 13797 llamado *Microbiota of the black cockle*.

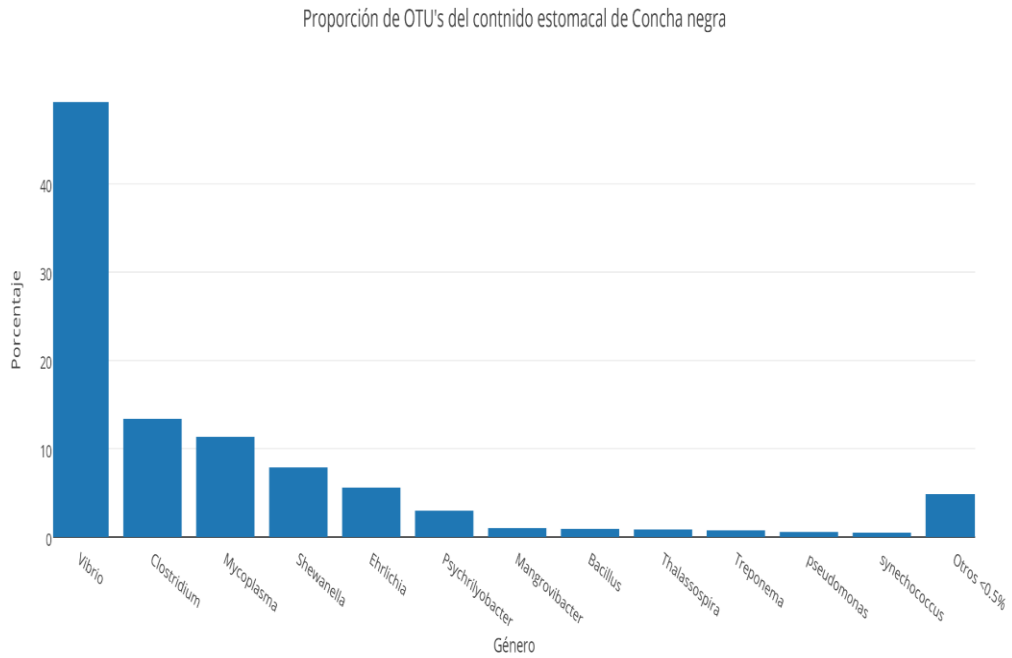
**Tabla 8** Estadísticas y generalidades de la sumisión de metagenomas en MG-RAST. Por razones desconocidas la hemolinfa 3 no presenta estadística de sumisión de datos.

General Statistics					
Muestra	Estómago1	Estómago3	Estómago4	Hemoglobina1	Hemoglobina3
avg gc content	49.201	52.397	52.224	52.505	
average length	257.535	261.889	257.557	266.213	
bp count	5601651	15431303	10561896	1033171	
file name	CN.E1.fasta	CN.E3.fasta	CN.E4.fasta	CN.H1M.fasta	CN.H3M.fasta
file size	7283771	19987926	13733131	1337252	
file type	Fasta	fasta	fasta	fasta	fasta
length max	302	321	327	295	
length min	173	173	173	175	

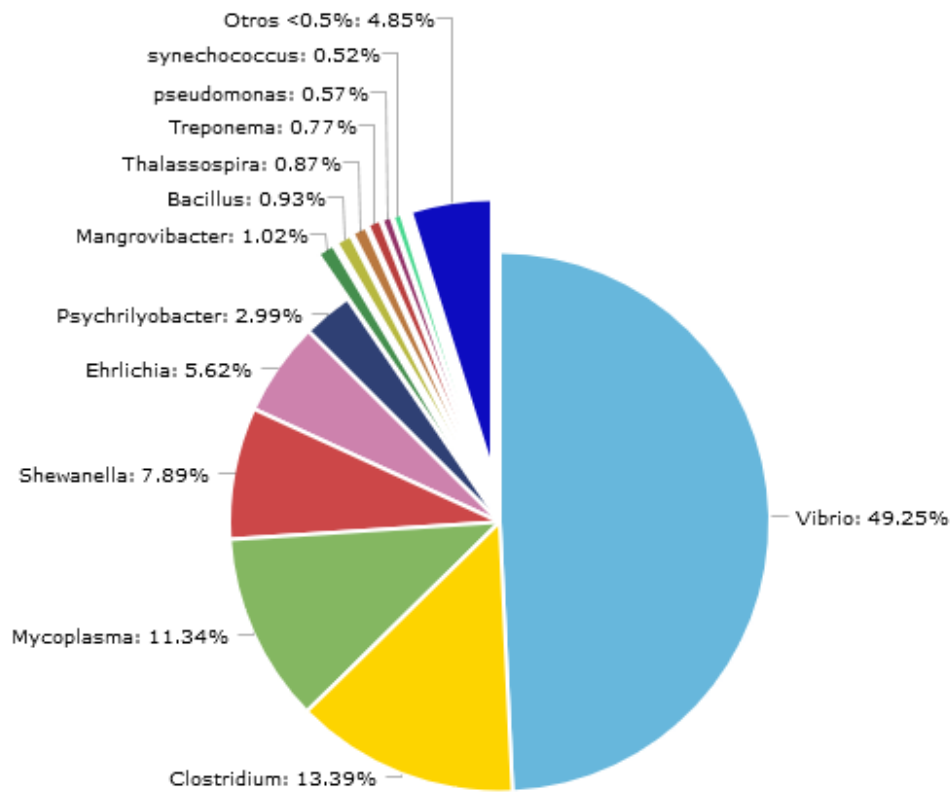
<b>sequence content</b>	DNA	DNA	DNA	DNA	DNA
<b>sequence count</b>	21751	58923	41008	3881	
<b>sequence type</b>	Amplicón	Amplicón	Amplicón	Amplicón	Amplicón
<b>type</b>	ASCII text	ASCII text	ASCII text	ASCII text	ASCII text
<b>unique id count</b>	21751	58923	41008	3881	

---

### 3.3. ANÁLISIS TAXONÓMICO

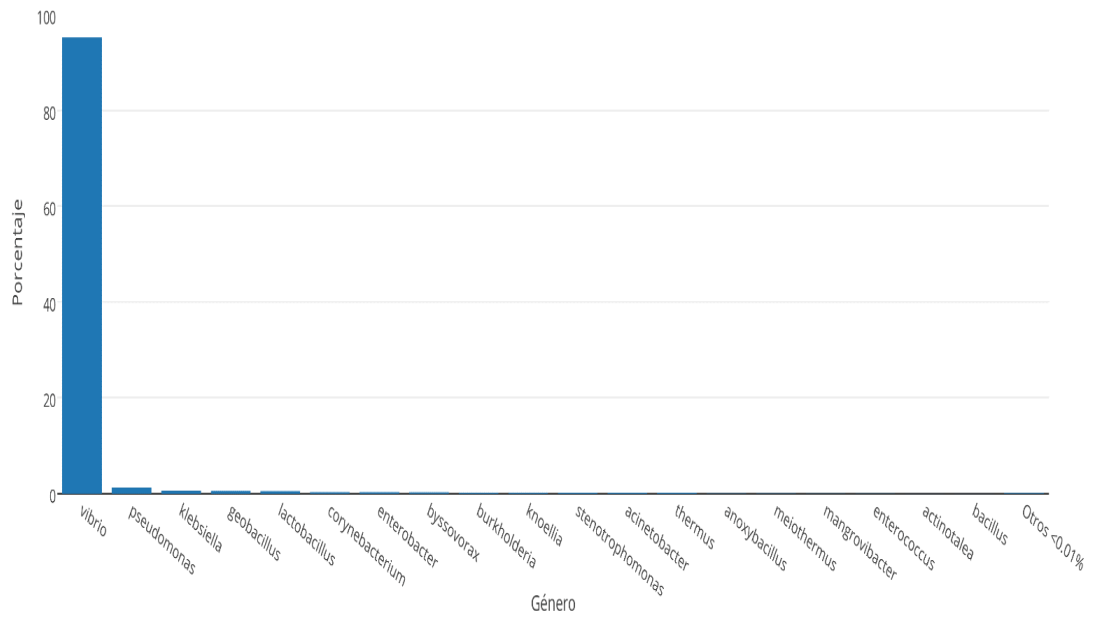


**Ilustración 9** Los niveles de OTU's presentes por género a nivel gastrointestinal de la Concha negra.

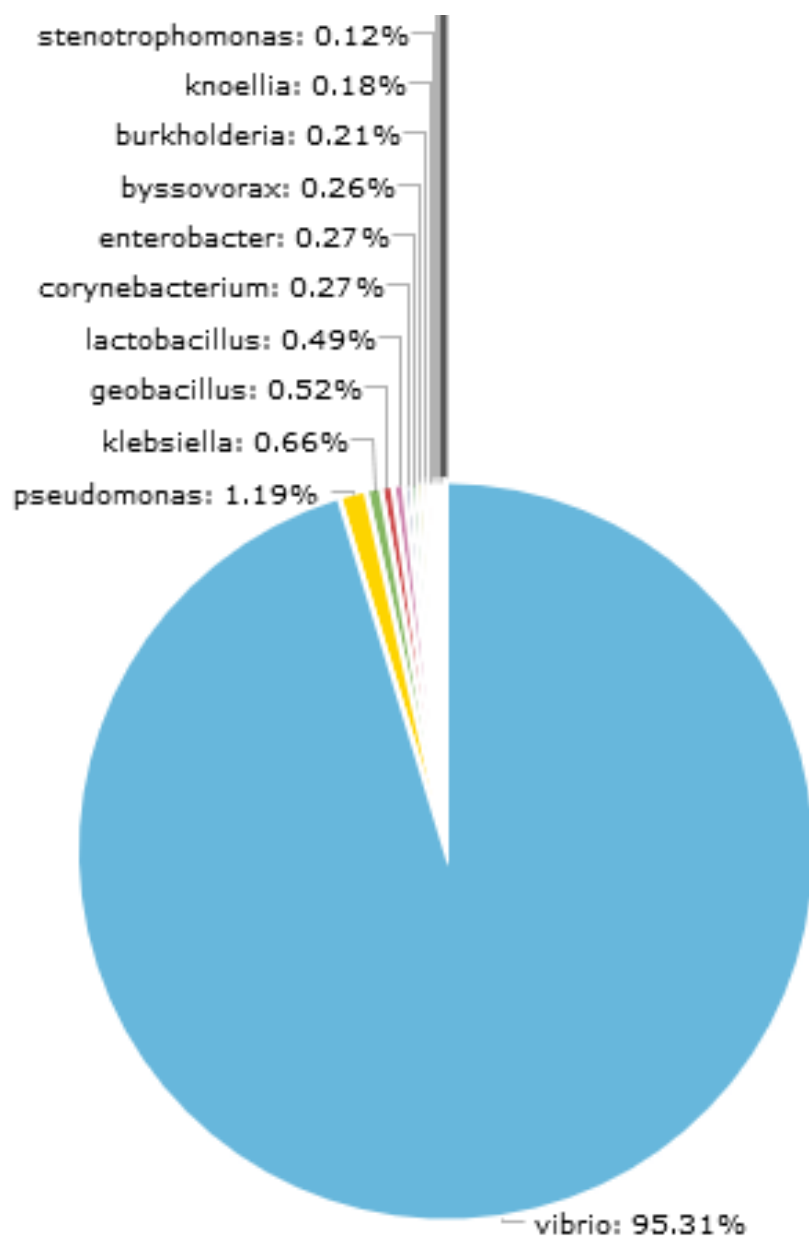


**Ilustración 10** Proporciones de OTU's a nivel de género en el contenido intestinal de la Concha negra.

Proporción de OTU's de la hemolinfa de la Concha negra



**Ilustración 11** Niveles de OTU's en la hemoglobina de la Concha negra.



**Ilustración 12** Proporciones de OTU's de la hemoglobina de la Concha negra.

### 3.3.1. Cepas cultivables

Según un aislamiento de bacterias de la hemoglobina mediante siembra en agar marino y selección continua realizado en INCA BIOTEC S.A.C., Como se observa en el árbol filogenético de la **Ilustración 20**, se obtuvieron secuencias resultando tener 8 especies con 28 cepas diferentes siendo la más abundante la especie de *Vibrio* con un 97.6% seguido de *actinobacter* con un 2.3% de todas las cepas cultivadas.

En la **Tabla 9** se observa a especies bacterianas con sus respectivas cantidades de abundancia, porcentaje de identidad, promedio de longitud de secuencia, viabilidad de cultivo y características patogénicas extraídas de la sumisión de datos en MG-RAST y en datos de NCBI en la web.

Como resultados se encontraron que 33 de las 67 (49%) especies registradas son posibles patógenos en datos de NCBI mientras que las bacterias no patógenas presentaron una frecuencia de 21 sobre 67 (31%) y un 13 de 67 (19%) aún se presentan desconocidas.

En ambos metagenomas las bacterias cultivables y no cultivables y datos aún desconocidos presentaron un porcentaje de 61%, 31% y 7% respectivamente.

**Tabla 9** Especies encontradas en el metagenoma de *A. tuberculosa* mostrando datos de abundancia y viabilidad de cultivo.

<b>Especie</b>	<b>Abundancia</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Medio</b>
Acetobacter pasteurianus	1	Cultured	Unknow
Agrobacterium tumefaciens	1	Cultured	Marine agar
Burkholderia thailandensis	1	Cultured	Blood agar
Campylobacter sp.	1	Cultured	Blood agar
Capnocytophaga canimorsus	15	Cultured	Blood agar
Capnocytophaga gingivalis	1	Cultured	Blood agar
Clostridium bifermentans	3	Cultured	Marine agar
Enterococcus canis	57	Cultured	Blood agar
Fibrobacter intestinalis	1	Cultured	Unknow
Flammeovirga aprica	13	Cultured	Marine agar
Flammeovirga yaeyamensis	1	Cultured	Marine agar
Flavobacterium branchiophilum	1	Cultured	Blood agar
Flavobacterium johnsoniae	2	Cultured	Blood agar
Flavobacterium sp. S1	1	Cultured	Blood agar
Frankia sp.	21	Cultured	Unknow
Fusobacterium mortiferum	1	Cultured	Blood agar
Geobacillus stearothermophilus	1	Cultured	Marine agar
Lactobacillus brevis	1	Cultured	Marine agar
Mesoplasma florum	1	Cultured	
Micrococcus luteus	1	Cultured	
Mycoplasma mobile	142	Cultured	Unknow
Mycoplasma pulmonis	19	Cultured	Unknow
Photobacterium damsela	1	Cultured	Marine agar
Pseudoalteromonas sp. 'A4 isolate-1'	1	Cultured	Marine agar
Pseudomonas plecoglossicida	6	Cultured	Marine agar
Stenotrophomonas maltophilia	5	Cultured	Blood agar
Synechococcus sp. MA0607	1	Cultured	Broth
Synechococcus sp. UBR	7	Cultured	Broth
Synechococcus sp. WH 7803	48	Cultured	Broth
Tenacibaculum maritimum	1	Cultured	Marine agar



Thermus sp. YBJ-1	2	Cultured	Unknow
Veillonella dispar	3	Cultured	Marine agar
Vibrio aestuarianus	71	Cultured	TCBS
Vibrio alginolyticus	920	Cultured	TCBS
Vibrio cholerae	609	Cultured	TCBS
Vibrio harveyi	65	Cultured	TCBS
Vibrio harveyi	29	Cultured	TCBS
Vibrio harveyi	4	Cultured	TCBS
Vibrio parahaemolyticus	6581	Cultured	TCBS
Vibrio parahaemolyticus	1	Cultured	TCBS
Vibrio sp.	70	Cultured	TCBS
Vibrio sp.	21	Cultured	TCBS
Vibrio sp.	21	Cultured	TCBS
Vibrio sp. BFLP-10	2	Cultured	TCBS
Vibrio splendidus	2	Cultured	TCBS
Vibrio vulnificus	1414	Cultured	TCBS
Vibrio vulnificus	1	Cultured	TCBS

---

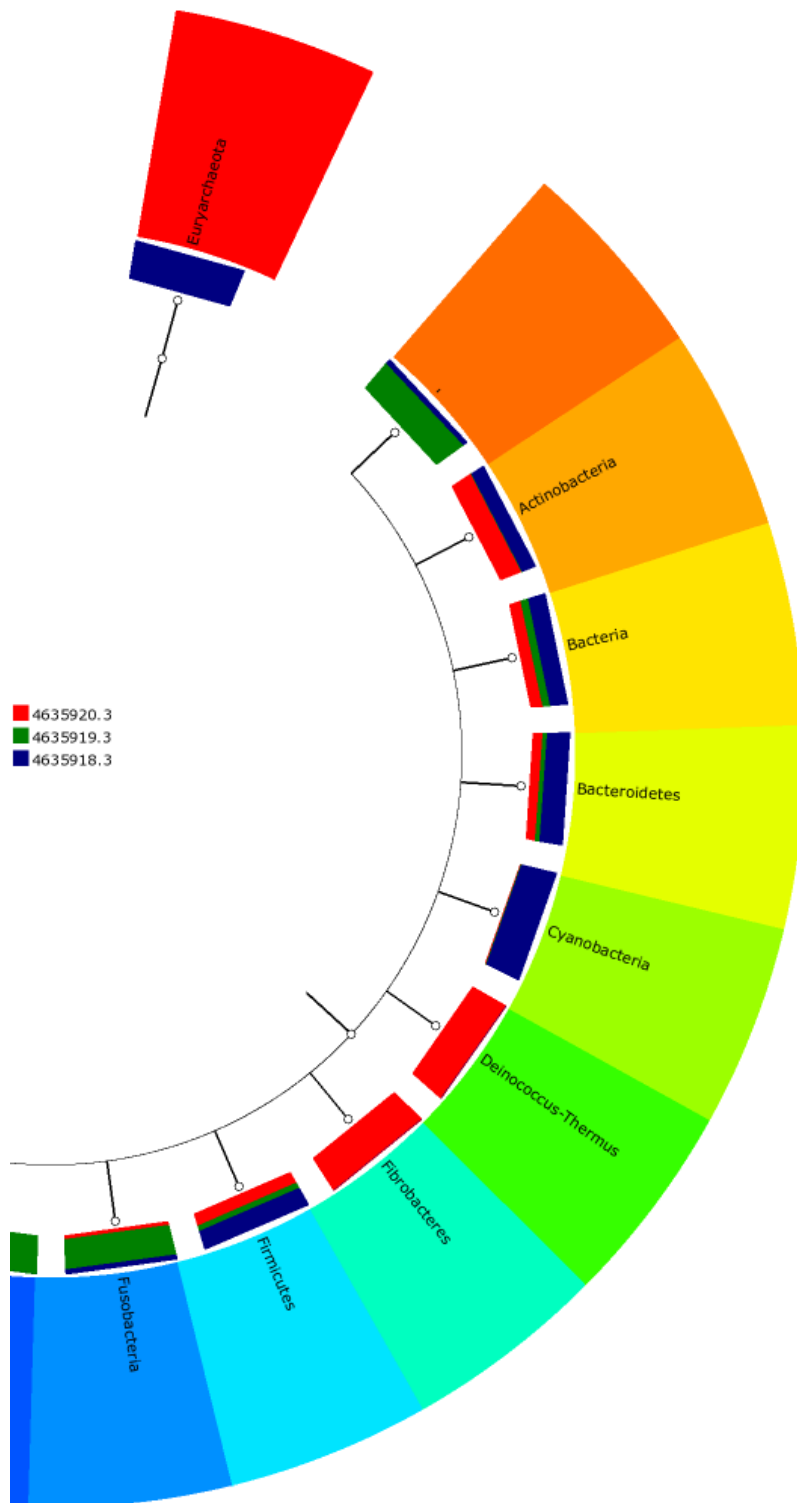
### 3.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizaron árboles circulares filogenéticos proporcionales por filo y especie con las muestras de estómago, hemoglobina y las muestras comparativas entre especies de estudio, la ostra y al mejillón.

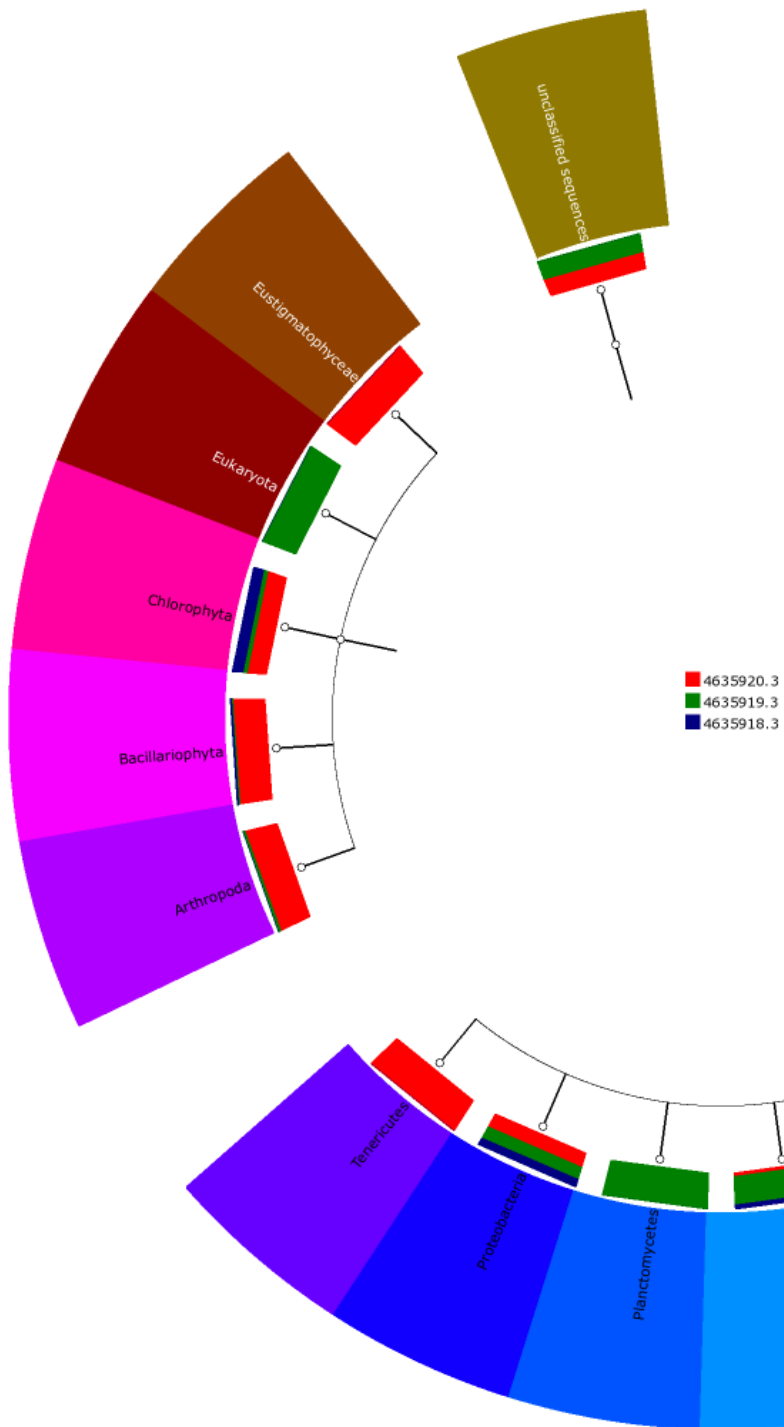
#### 3.4.1. Filogenia de especies y phylum de muestras del estómago.

Se encontraron 12 filo de bacteria: Proteobacteria, Tenericutes, Cyanobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Deinococcus-thermus, Fibrobacteres. Entre los cuales el filo proteobacteria presenta dominancia y diversidad con respecto a las demás. Como lo muestra la **Ilustración 13** e **Ilustración 15** las secuencias no son homogéneas para todas las tres muestras de estómago, de hecho varían dependiendo del sitio de recolección.

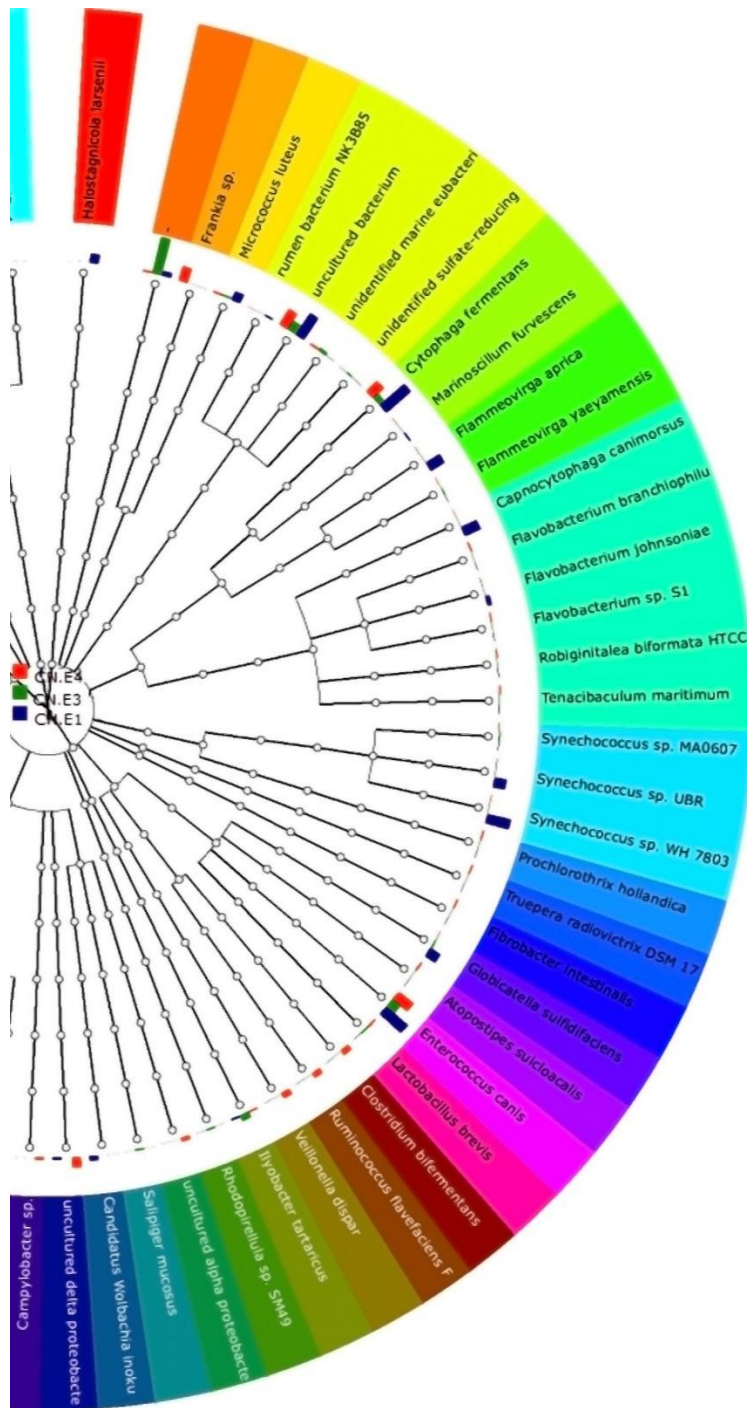
Se observa en el metagenoma de la tabla de la **Ilustración 14**, varios organismos eucariotas forman parte del análisis. Estando ente ellos el Phylum artrópoda, chlorophyceae, entre otros.



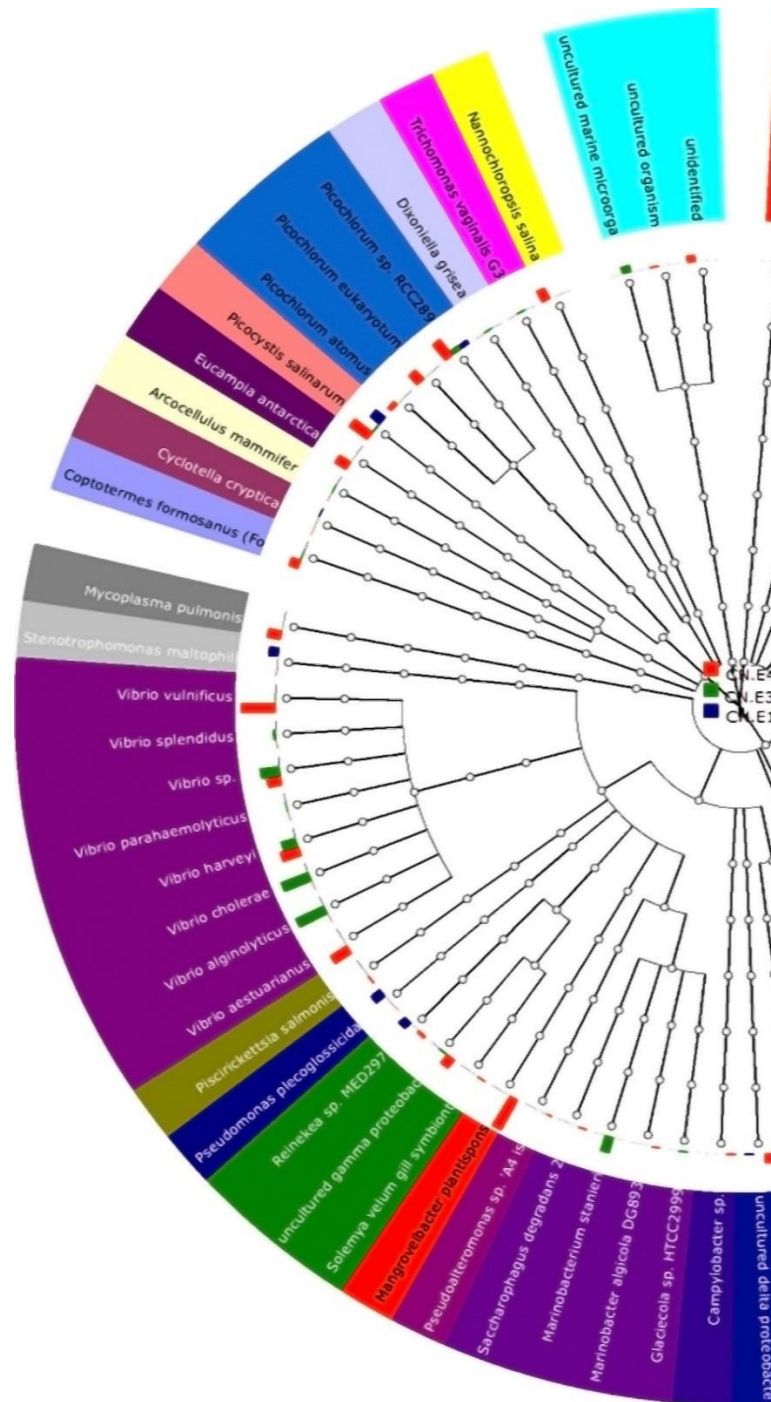
**Ilustración 13** Árbol filogenético circular proporcional de los phylum encontrados en los metagenomas del estómago de *A. tuberculosa*. Parte 1



**Ilustración 14** Árbol filogenético circular proporcional de los phylum encontrados en los metagenomas del estómago de *A. tuberculosa*. Parte 2

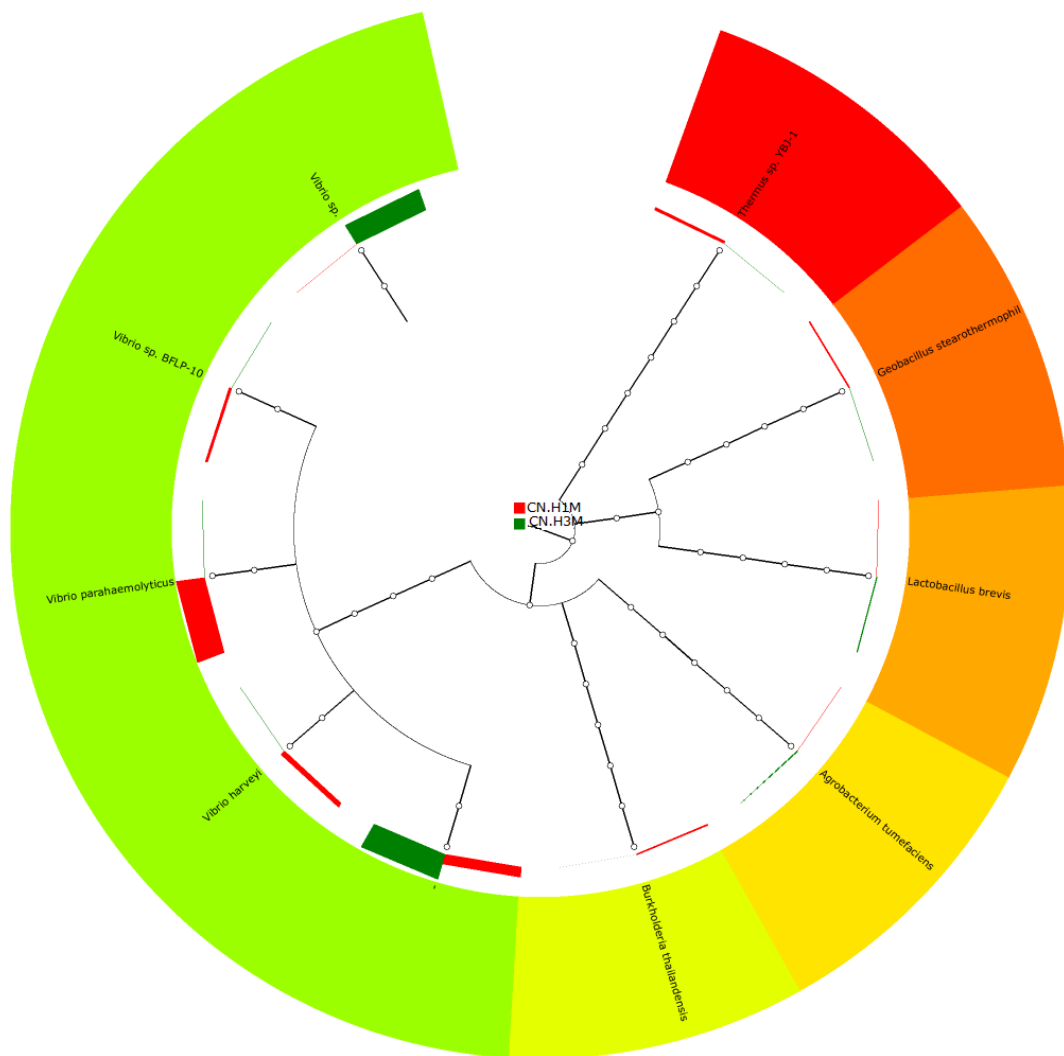


**Ilustración 15** Árbol filogenético de las bacterias del tracto digestivo de la Concha negra parte 1.



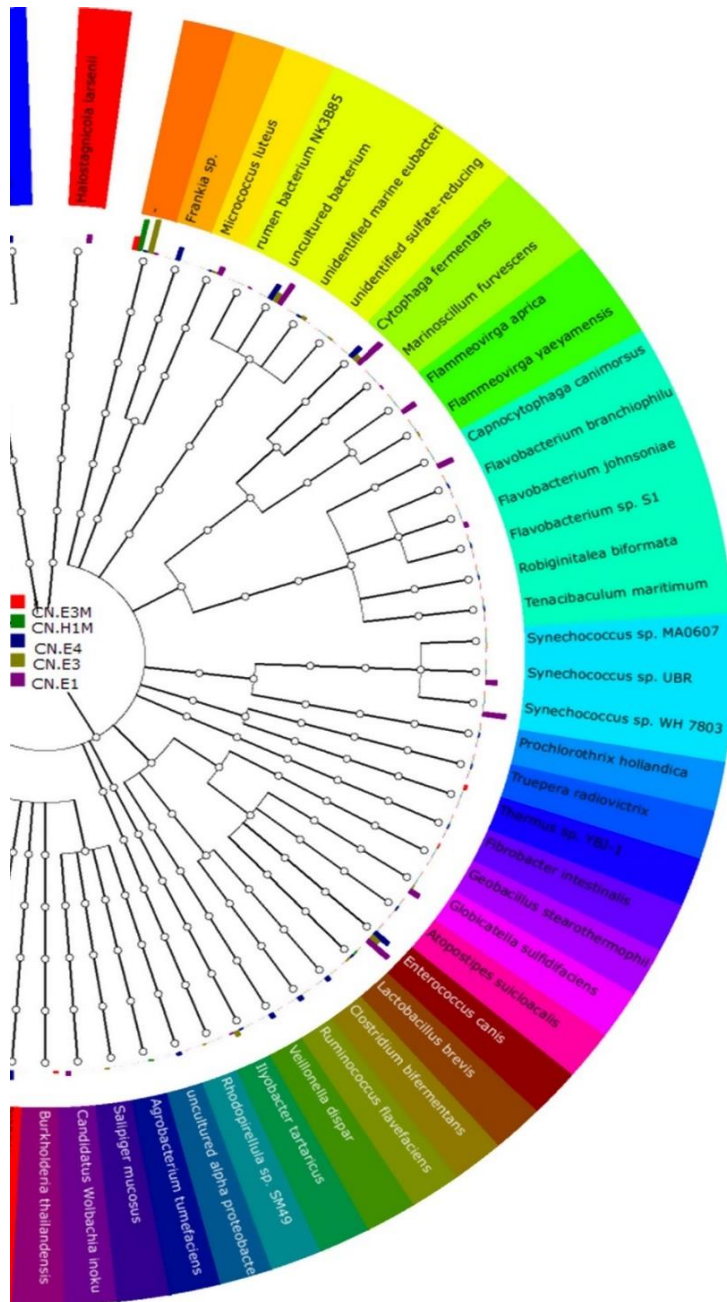
**Ilustración 16** Árbol filogenético de las bacterias del tracto digestivo de la Concha negra parte 2.

### 3.4.2. Filogenia de especies de la hemoglobina de *A. tuberculosa*.



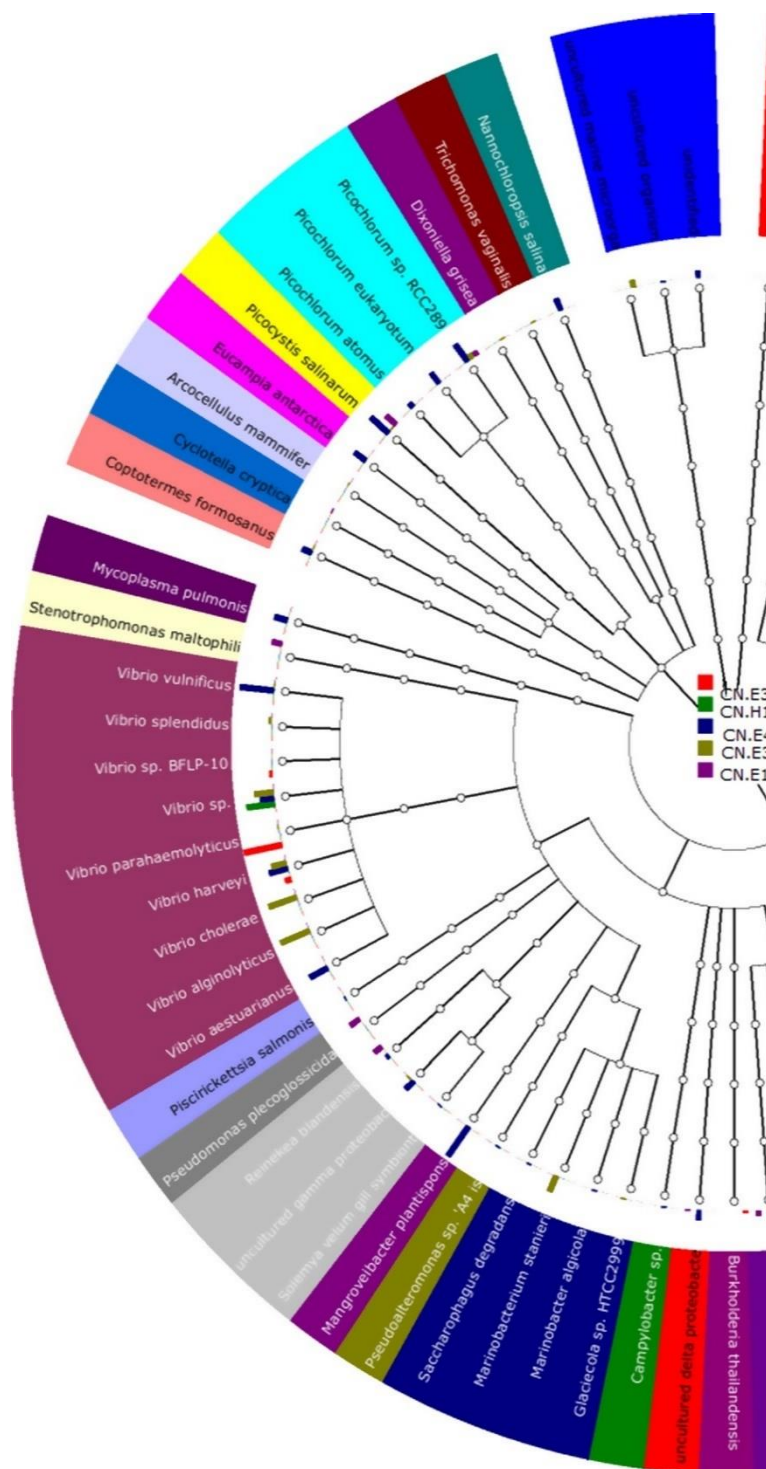
**Ilustración 17** Filogenia de las bacterias extraídas de la hemoglobina de la Concha negra.

3.4.3. Filogenia total de especies en el microbioma de *A. tuberculosa*



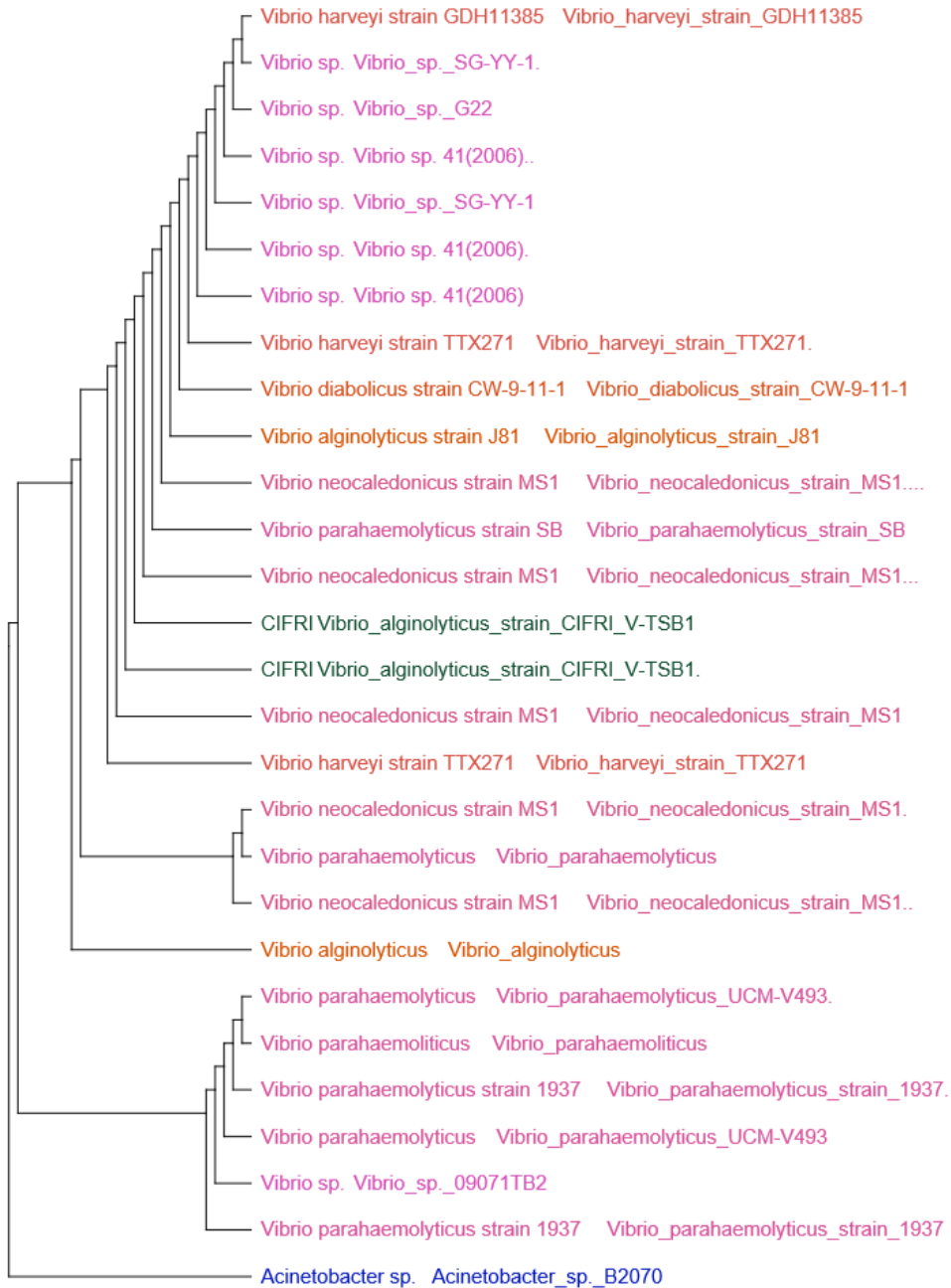
**Ilustración 18** Filogenia total de la microbiota de la Concha negra *Anadara tuberculosa*. Parte 1.





**Ilustración 19** Filogenia total de la microbiota de la Concha negra *Anadara tuberculosa*. Parte 2.

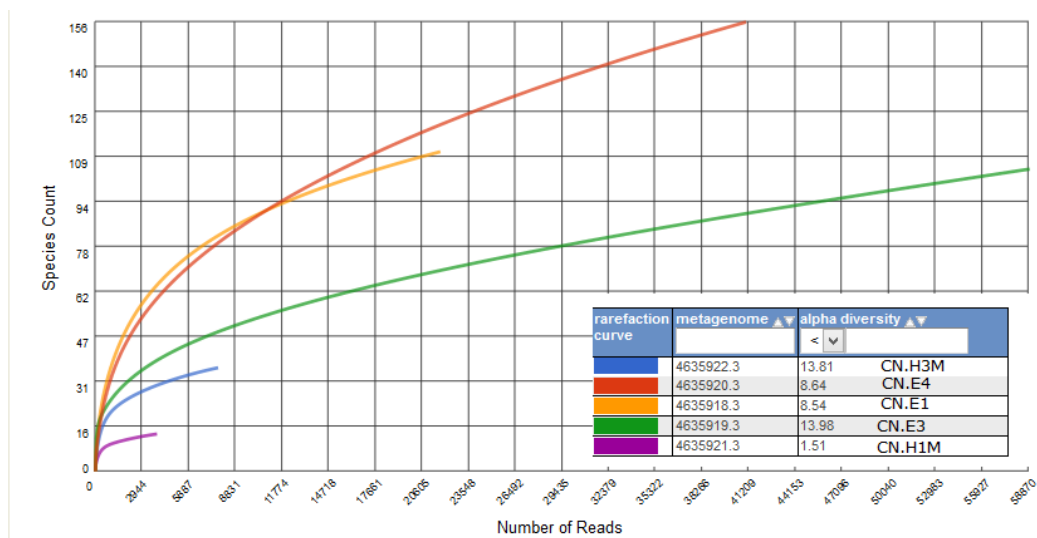
### 3.4.4. Filogenia de Bacterias aisladas y cultivadas



**Ilustración 20** Árbol filogenético de especies cultivadas aisladas de la hemoglobina y estómago de la Concha negra. Fuente: **Concepto Azul**

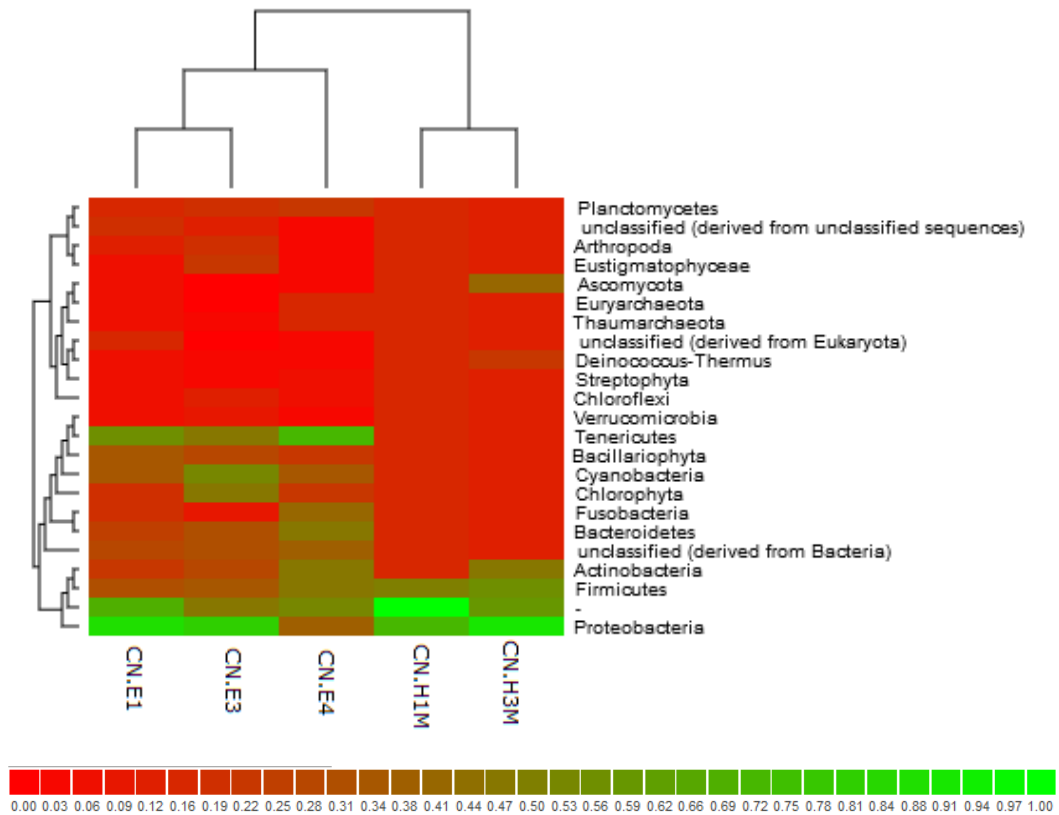
### 3.5. DIVERSIDAD DE OTU's

Los resultados indican que existe una menor variedad de bacterias en *A. tuberculosa* relativa a otras especies. Siendo así que *A. tuberculosa* presenta un conteo de especies aproximado de 150 especies en el estómago, mientras que la ostra presenta unos 380 y el mejillón con 600. La comparación entre los niveles más alto de diversidad producida por los análisis en tres especies estuarinas como la Ostra (*Crassostrea virginica*) y em mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) tienen como resultado los siguientes datos de diversidad alfa: 56,68 y 156,37 respectivamente, superando por 4 y 11 al alfa diversidad de la Concha negra: 13,45



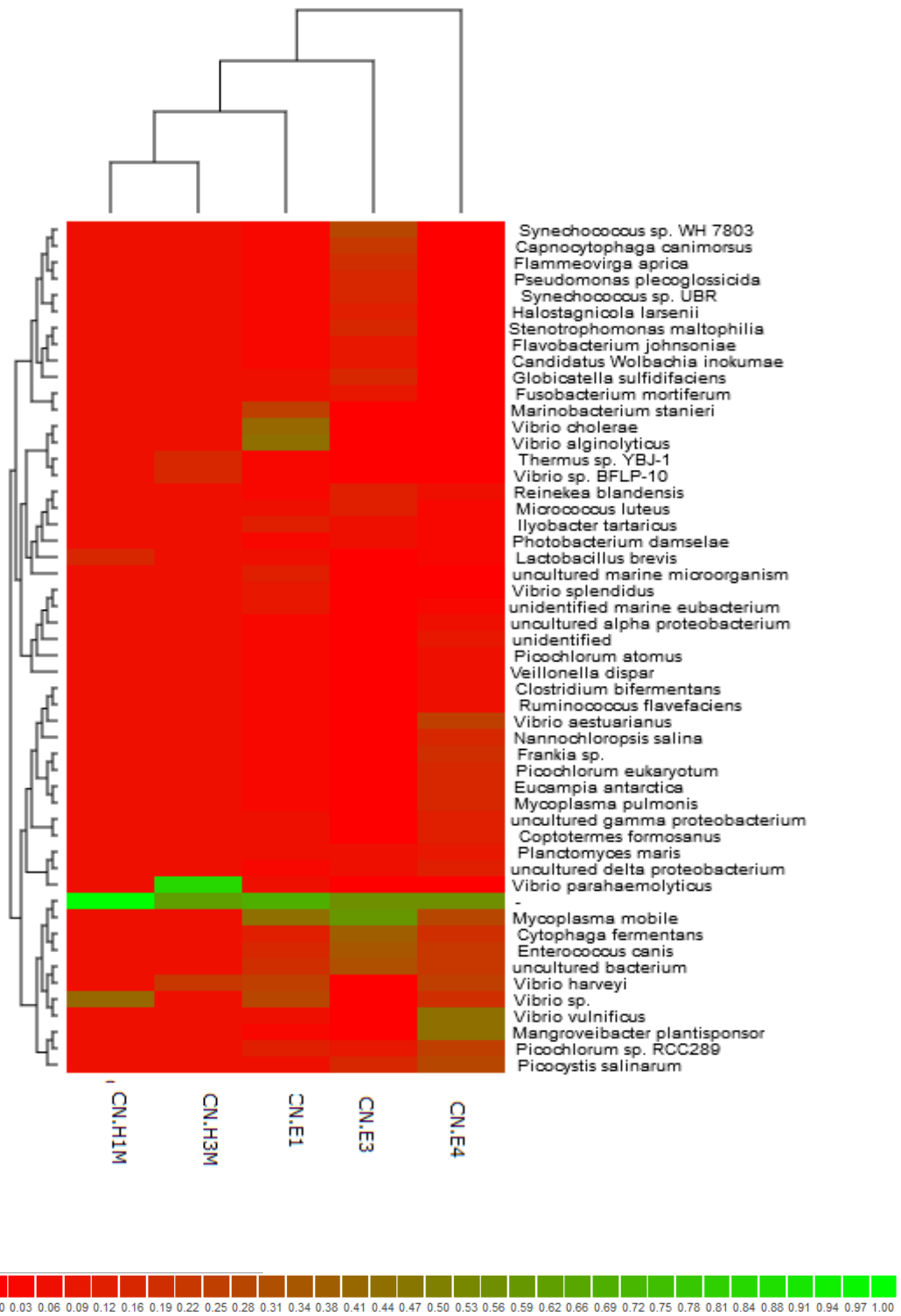
**Ilustración 21** Curva de rarefacción de diversidad de OTU's de los metagenomas de la Concha negra

### 3.6. COMPARACIÓN METAGENÓMICA

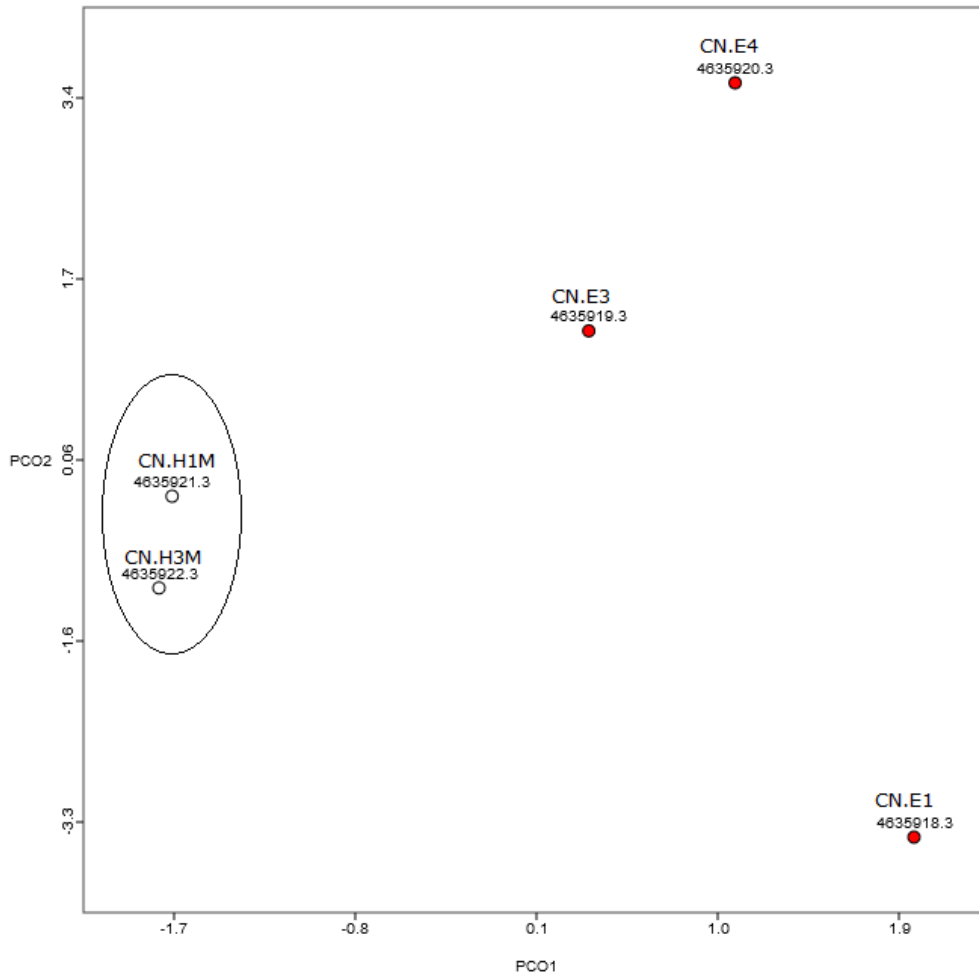


**Ilustración 22** Heatmap de especies agrupadas por phylum.

En los resultados del HEATMAP de la **Ilustración 22** e **Ilustración 23** se observa que los metagenomas de la hemolinfa presentan similitudes. Mientras que los metagenomas de los estómagos presentan varianza de especies y abundancia entre ellos. Así también lo demuestra un análisis de PCoA disgregándolos en dos grupos. **Ilustración 24.**

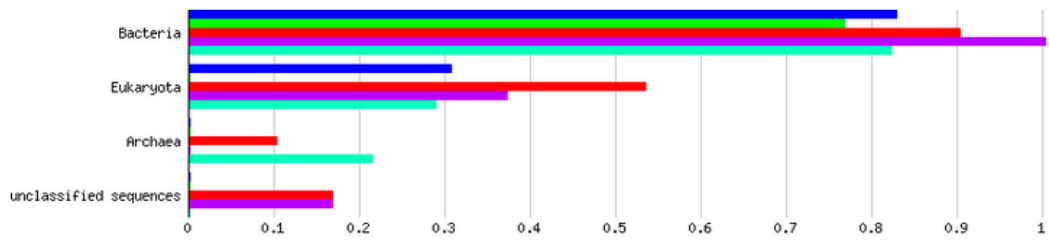


**Ilustración 23** Heatmap de los metagenomas agrupados por phylum

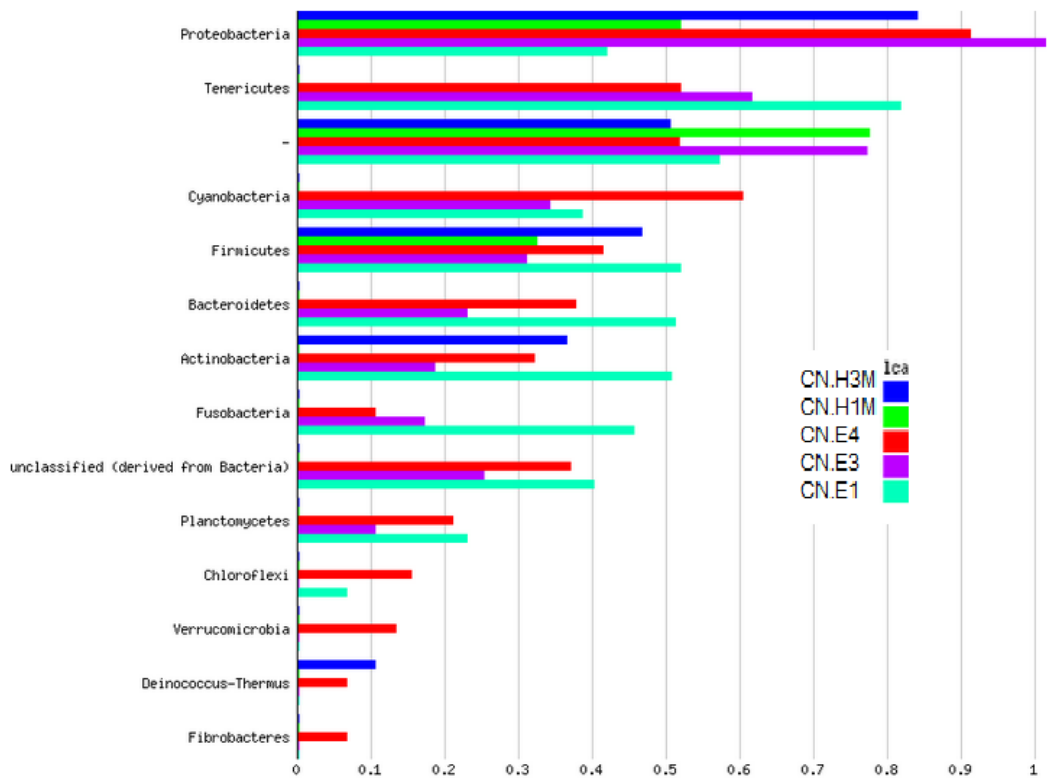


**Ilustración 24** Mapa de distribución 2D mediante distancias de Bray Curtis. Las muestras de hemoglobina se encuentran agrupadas mientras que las muestras de intestino presentan metagenomas totalmente aislados e independientes uno de otra mostrando poca uniformidad.

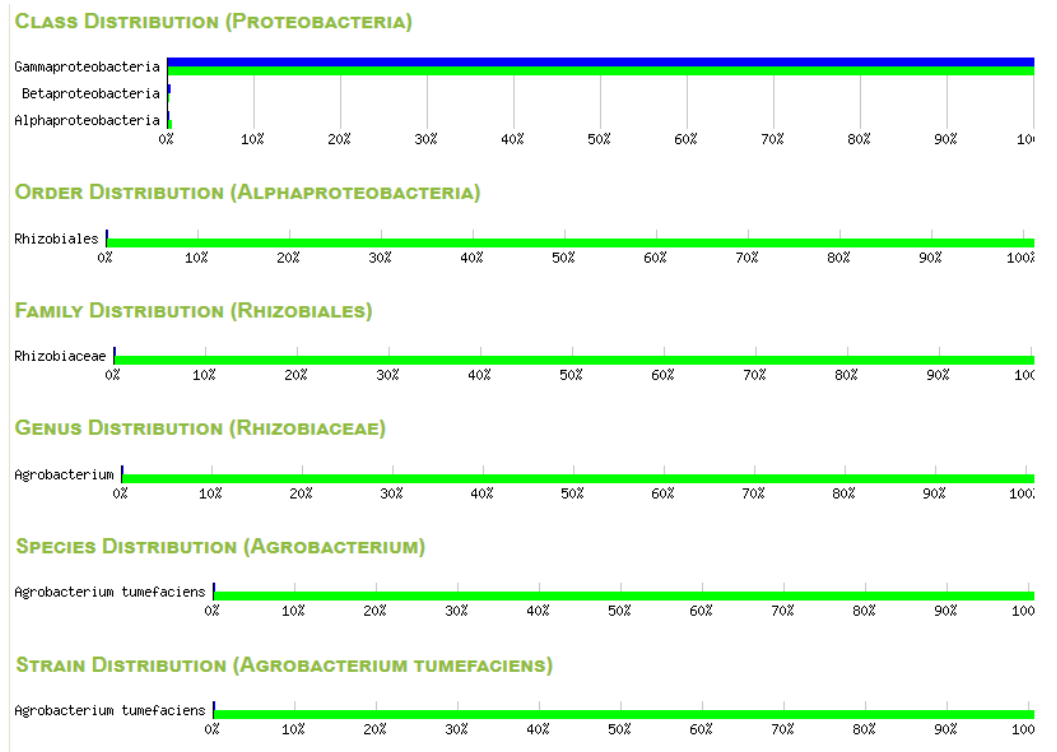
### DOMAIN DISTRIBUTION



### PHYLUM DISTRIBUTION (BACTERIA)



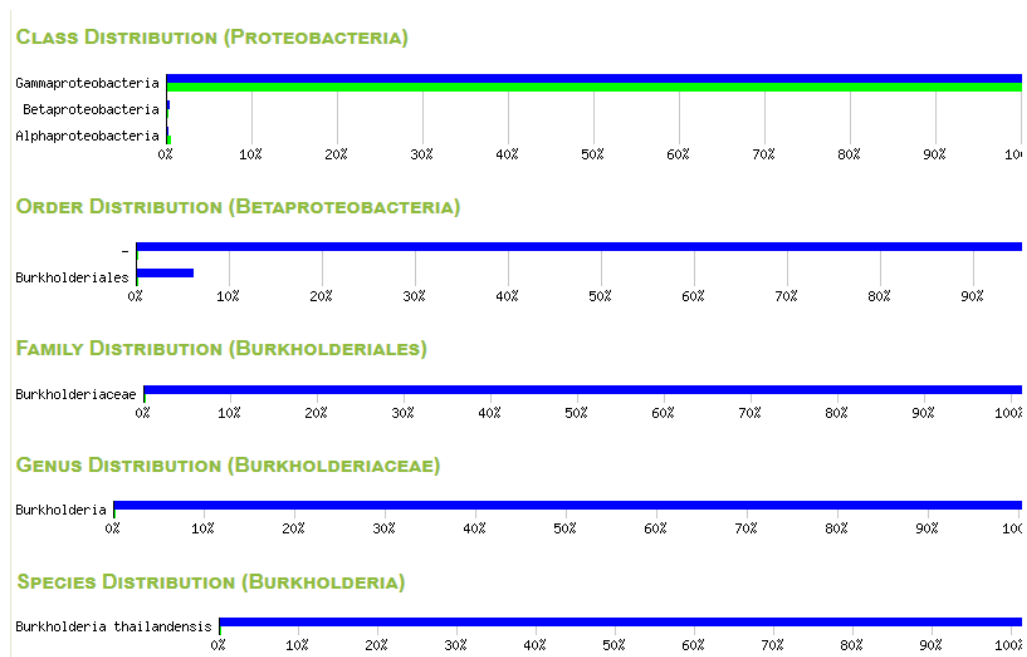
**Ilustración 25** Perfil procariota de los metagenomas secuenciados. Siendo el filo proteobacteria y tenericutes los más dominantes relativamente.



**Ilustración 26** Barchart de escalas taxonómicas de el orden alphaproteobacteria de la hemoglobina de *Anadara tuberculosa*.

Como parte del orden alfaproteobacteria, tenemos un organismo de la familia Rizobiales encontrados en uno de las muestras de hemoglobina de la concha negra. Siendo el género *Agrobacterium* el único organismo presente en esta clasificación. Tiene características de ser una bacteria intracelular de las raíces de los manglares. Ver **Ilustración 26**.

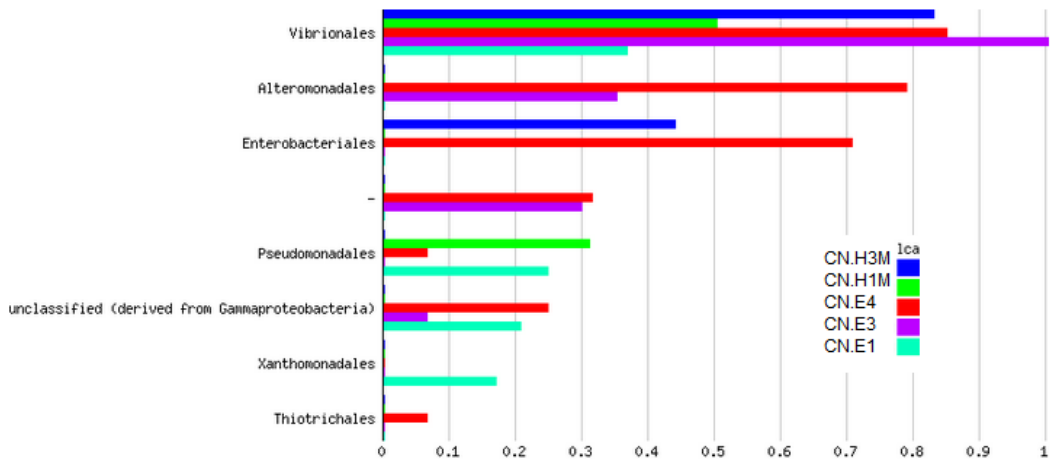




**Ilustración 27** Especies encontrada en el orden Betaproteobacteria de la hemoglobina de *Anadara tuberculosa*.

Así mismo en el segundo orden del phylum proteobacteria mostrado en la **Ilustración 27**, se encuentra el phylum betaproteobacteria con un gran porcentaje de bacterias no reconocidas y con un género Burkholderia con la especie thailandensis. Este género es un grupo de bacterias patogénicas en animales y humanos cual especie solo ha sido reportada como bacilo gram negativo móvil no fermentativa que se encuentra naturalmente en suelos (Wuthiekanun et al., 1996).

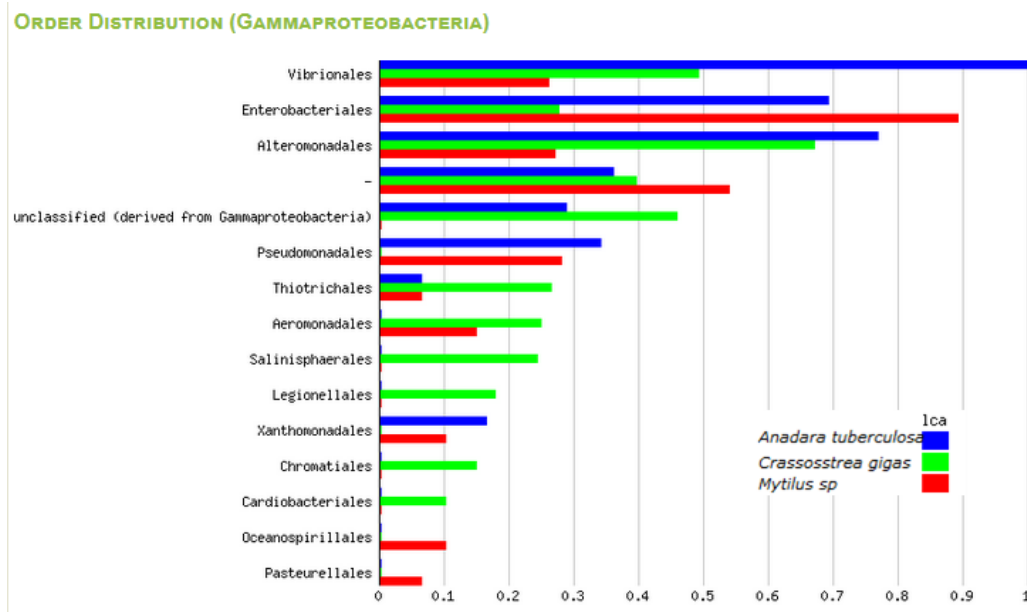
### ORDER DISTRIBUTION (GAMMAPROTEOBACTERIA)



**Ilustración 28** Taxones encontrados en el orden gama-proteobacteria de la hemoglobina y estómago de *Anadara tuberculosa*.

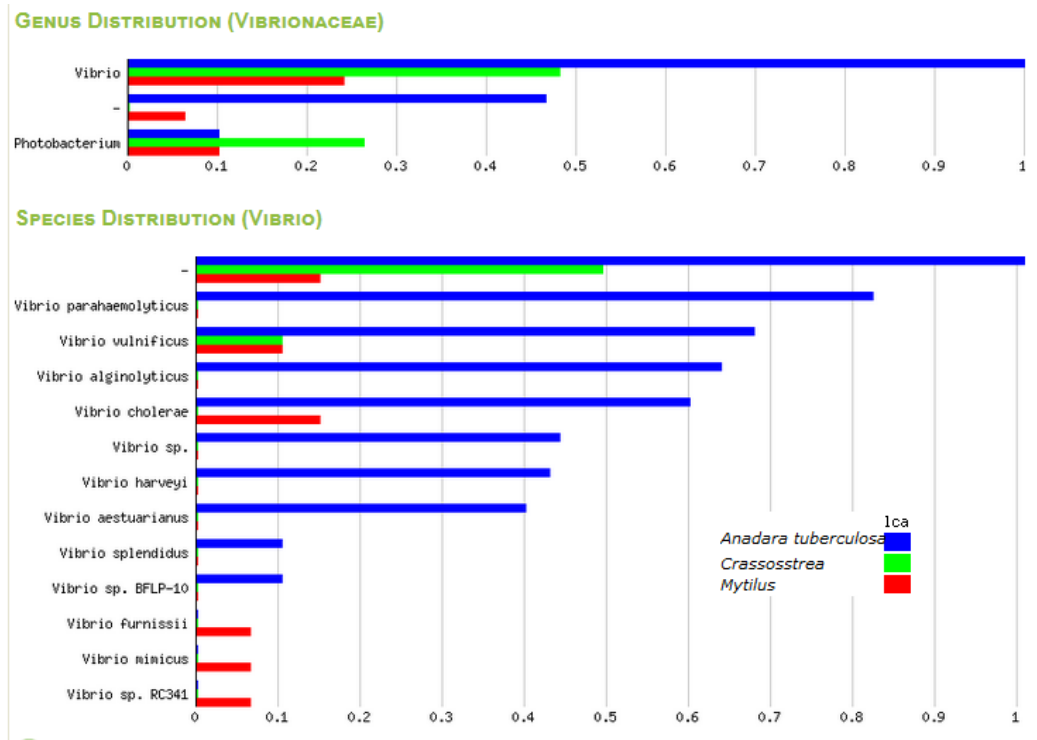
El Orden gamaproteobacteria es el orden más abundante en el metagenoma bacteriano de la concha negra. Se observa que la familia Vibrionales representa una abundancia superior a las otras familias en todos los tejidos. Seguido de alteromonadales que solo se presenta en tejidos estomacales así como también lo están la familia Pseudomonadales Xantomonadales y Thiotrichales.

### 3.7. COMPARACIÓN METAGENÓMICA ENTRE ESPECIES ESTUARINAS



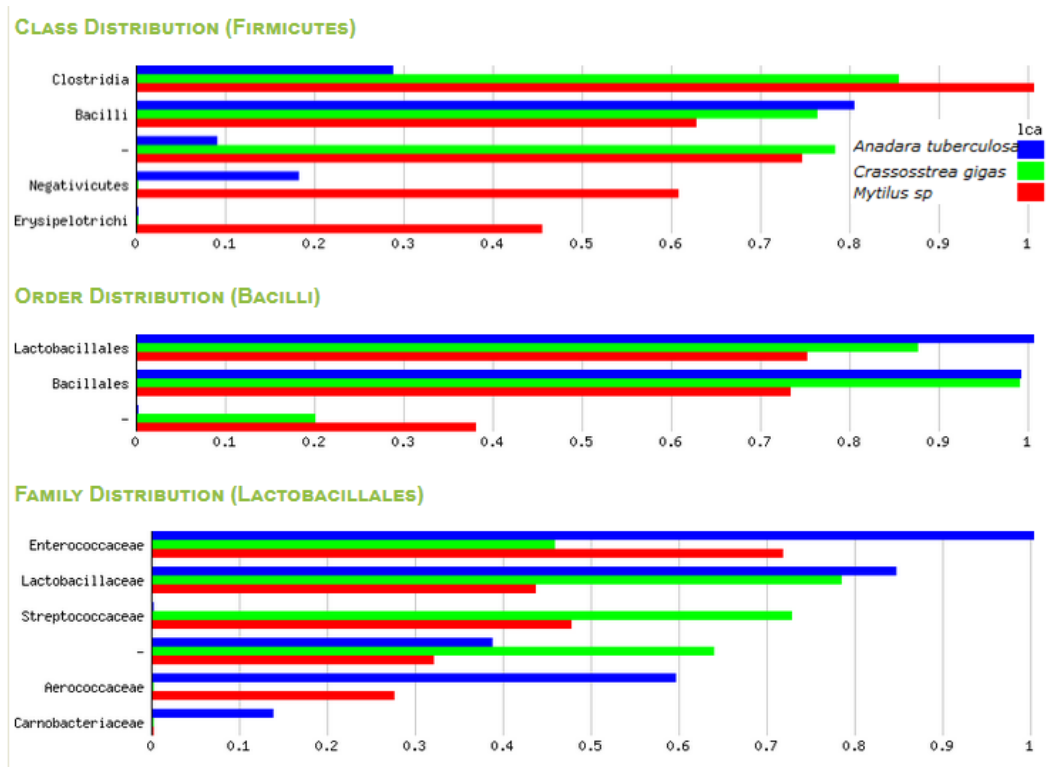
**Ilustración 29** Comparación de metagenomas entre familias del orden de gamma-proteobacteria de *Anadara tuberculosa* (azul), *Crassostrea virginica* (verde), y *Mytilus galloprovincialis* (rojo). FUENTE: (Craft et al., 2010; King et al., 2012)

Así mismo se compararon los metagenomas de las familias del Orden Gammaproteobacteria en los metagenomas totales de dos especies estuarinas: *Crassostrea virginica* y *Mitylus galloprovincialis*

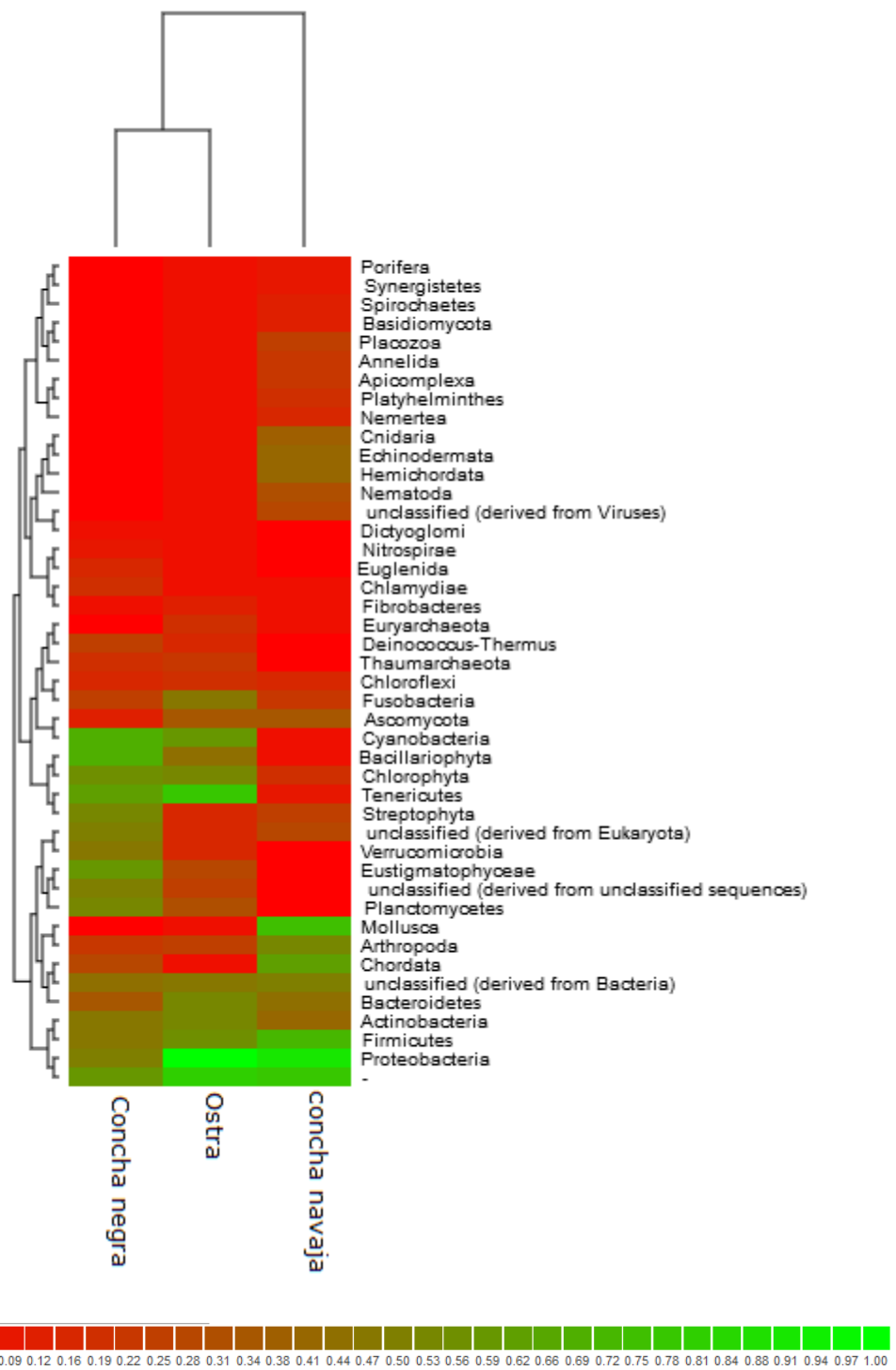


**Ilustración 30** Comparación de abundancia de vibrios entre tres especies de organismos: *Anadara tuberculosa* (azul), *Crassostrea virginica* (verde), y *Mytilus galloprovincialis* (rojo). FUENTE: (Craft et al., 2010; King et al., 2012)

Como se observa en la **Ilustración 30**, en las tres especies estuarinas la presencia de Vibrio está fuertemente marcada en *Anadara tuberculosa* duplicando y triplicando su abundancia y diversidad con la ostra y el mejillón, Por otro parte en la **Ilustración 31**, el phylum firmicutes presenta una distribución similar en las tres especies estuarinas incluyendo concha negra.



**Ilustración 31** Comparación metagenómica del filo Firmicutes en *Anadara tuberculosa* (azul), *Crassostrea virginica* (verde), y *Mytilus galloprovincialis* (rojo). FUENTE: (Craft et al., 2010; King et al., 2012)



**Ilustración 32** Cuadro heatmap comparativo de microbiomas de tres tipos de especies estuarinas. FUENTE: (Craft et al., 2010; King et al., 2012)

### 3.8. BASE DE DATOS BIOPROSPECCIÓN PROBIÓTICO

La cantidad de bacterias que no presentan antecedente virulento o patógeno en la acuicultura y medicina encontradas en el microbioma de la concha negra *A. tuberculosa* es de 64 especies. Como se aprecia en la **Tabla 10** existen tres especies que presentan referencia de actividad probiótica en cultivos de bivalvos. Así como el resto de las 61 especies no presenta antecedentes de investigación referente a actividad probiótica pero existe la probabilidad de serlo. De esas 61 especies, solo 18 son cultivables por medios selectivos.

**Tabla 10** Cepas de características no patógenas aún no registradas de interés de bioprospección probiótica.

<b>Especie</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Patogenicidad</b>	<b>Referencia</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Cultured	Non pathogen	-
<i>Synechococcus</i> sp. WH 7803	Cultured	Non pathogen	-
<i>Frankia</i> sp.	Cultured	Non pathogen	-
<i>Flammeovirga aprica</i>	Cultured	Non pathogen	-
<i>Synechococcus</i> sp. UBR	Cultured	Non pathogen	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	Cultured	Non pathogen	-
<i>Veillonella dispar</i>	Cultured	Non pathogen	-
<i>Thermus</i> sp. YBJ-1	Cultured	Non pathogen	-
<i>Flammeovirga yaeyamensis</i>	Cultured	Non pathogen	-
<i>Geobacillus</i>			-
<i>stearothermophilus</i>	Cultured	Non pathogen	
<i>Lactobacillus brevis</i>	Cultured	Non pathogen	-
<i>Synechococcus</i> sp. MA0607	Cultured	Non pathogen	-

Tenacibaculum maritimum	Cultured	Non pathogen	-
Fibrobacter intestinalis	Cultured	Unknow	-
Acetobacter pasteurianus	Cultured	Unknow	-
Mesoplasma florum	Cultured	Unknow	-
Photobacterium damsela	Cultured	Unknow	-
Mangroveibacter plantisponsor	Uncultured	Non pathogen	-
Ilyobacter tartaricus	Uncultured	Non pathogen	-
Ruminococcus flavefaciens	Uncultured	Non pathogen	-
Marinobacter algicola	Uncultured	Non pathogen	-
Saccharophagus degradans	Uncultured	Non pathogen	-
Salipiger mucosus	Uncultured	Non pathogen	-
Solemya velum gill symbiont	Uncultured	Non pathogen	-
Cytophaga fermentans	Uncultured	Unknow	-
uncultured bacterium	Uncultured	Unknow	-
uncultured marine microorganism	Uncultured	Unknow	-
Candidatus Wolbachia inokumae	Uncultured	Unknow	-
			(Jorquera et al., 2000; Prado et al., 2010) (Prado et al., 2010)
Vibrio sp.	Cultured	Probiotic	
Pseudomonas plecoglossicida	Cultured	Probiotic	
uncultured alpha proteobacterium	Uncultured	Unknow	-
Glaciecola sp. HTCC2999	Uncultured	Unknow	-
Rhodopirellula sp. SM49	Uncultured	Unknow	-
Teredinibacter turnerae	Uncultured	Unknow	-
Truepera radiovictrix	Uncultured	Unknow	-
uncultured delta proteobacterium	Uncultured	Unknow	-



uncultured	gamma			-
proteobacterium		Uncultured	Unknow	
Atopostipes suicloacalis		Uncultured	Unknow	-
Marinoscillum furvescens		Uncultured	Unknow	-
Robiginitalea biformata		Uncultured	Unknow	-
Chthoniobacter flavus		Uncultured	Unknow	-
Prochlorothrix hollandica		Unknow	Non pathogen	-
Unclassified		Unknow	Unknow	-
Marinobacterium stanieri		Unknow	Unknow	-
Planctomyces maris		Unknow	Unknow	-
unidentified	marine			-
eubacterium		Unknow	Unknow	
unidentified	sulfate-reducing			-
bacterium		Unknow	Unknow	
Reinekea blandensis			Unknow	-
				(Rodrigues
Pseudoalteromonas sp. 'A4				et al.,
isolate-1'		Cultured	Probiotic	2015)

---

## CAPÍTULO 4

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

En el componente de identificación de la estructura de la microbiota tenemos que la especie más dominante en el metagenoma bacteriano de *A. tuberculosa* fue el género *Vibrio* con la especie *Vibrio parahaemolyticus* representando un 53% de las secuencias totales de los 5 metagenomas. El género *Vibrio* tuvo una representación del 95.31% de las secuencias obtenidas en la hemoglobina mientras obtuvo un 49.25% de prevalencia en el estómago. Los géneros de bacteria que prevalecen en segundo plano en el estómago fueron *Clostridium* y *mycoplasma* con un 13,3% y 11.34% respectivamente y en hemoglobina fue *pseudomonas* con un 1.19%.

Se identificaron bacterias cultivables y no cultivables mediante la búsqueda en la base de datos y aislamiento *in vitro*. En la parte metagenómica, de las 77 especies procariontas analizadas, un 61% son potencialmente cultivables según bibliografía y datos de NCBI y el otro 38,9% no lo son o presenta

información desconocida e incompleta. Las especies aisladas y cultivadas *in vitro* en agar marino fueron 7 especies de *Vibrio* y un acinetobacter, que comparado con el metagenoma el cultivo representa un 10% conteniendo las mismas especies con la excepción del *Vibrio diabolycus*.

Por otro lado los metagenomas de hemoglobina presentan una similaridad entre ellos, contrario a los metagenomas del estómago que parecen tener cierta diferenciación entre los individuos, tal vez relacionado por la diferencia entre los puntos de muestreo debido a que mantienen un contacto directo con el ambiente. Se recuerda que los parámetros físicos de aquellos sitios eran idénticos. Además, la diversidad de especies de la hemoglobina varía entre 15-30, mientras que el estómago presentaba un número de 5 a diez veces mayor, de 100 a 150 especies.

Respecto a la comparación metagenómica entre tres especies de organismos estuarinos como la ostra y el mejillón, estas presentaron un número mayor de diversidad alfa en comparación con la Concha negra. *A. tuberculosa* que presenta una  $\alpha D$  13.54 mientras que *C. virginica* y *M. galloprovincialis* bordeaban a una  $\alpha D$  55,68 y 156,14 respectivamente.

Otra particularidad que presenta *A. tuberculosa* con respecto a la abundancia del filo gammaproteobacteria es su diversidad y su abundancia de *Vibrio* con respecto a otros organismos llegando a superar en casi al triple a *C. virginica* y *M. edulis*

Los Phylum más comunes en el metagenoma del estómago fueron los esperados, comenzando por Termericutes, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, Planctomicetes entre otros.

Con respecto al filo Firmicutes, *A. tuberculosa* presenta una abundancia relativamente igual con los metagenomas de las demás especies estuarinas, igualmente en el orden bacili, y la familia Lactobaciliares y Baciliares, que por lo general son los que mayormente aportan en la investigación de probióticos.

Respecto a la base de datos de prospección aún no se sabe a ciencia cierta si los organismos cultivables que no han presentado antecedentes de patogenicidad sean causantes de enfermedades en concha negra. Pero se presentan 55 especies entre cultivables y no cultivables que muestran la posibilidad de ser usados como probióticos y a su vez tres de ellos están

referenciados por ser aislados y usados como probióticos en cultivos de bivalvos.

Este trabajo representa el primer reporte de Metagenómica de Concha negra (*A. tuberculosa*) siendo esta un recurso de interés económico y social en toda la costa del Pacífico desde México hasta Perú. Así como también, el primer reporte de metagenómica de la hemolinfa (en este caso Hemoglobina) de un organismo invertebrado.

## 4.2. Recomendaciones

Se necesitan secuencias mayores a 400 pares de base para que no ocurran problemas de lecturas de secuencia. Se recomienda usar tecnologías que secuencien un mayor rango de longitud como 454 Roche FLX. Para poder usar la opción BEST HIT CLASSIFICATION de MG-RAST que permite una identificación por encima del 95% de similitud.

Se considera que la salinidad u otros factores ambientales podrían ser un buen modelo para evaluar el estrés biótico y su cambio en las fluctuaciones de las poblaciones bacterianas en el microbioma del hospedador. Como para comprender lo que sucede a nivel microecológico en diferentes ambientes y cuál es la reacción del hospedador ante estos cambios.

Se propone un estudio detallado en animales sanos y enfermos para realizar un estudio comparativo de metagenomas enfocado a la microecología. Se piensa que el desequilibrio poblacional de bacterias provoca inestabilidad en el control de las colonias patógenas incitando infecciones y problemas en acuicultura.

La importante prevalencia de bacterias de tipo *Vibrios* asociada a la concha negra introduce una nueva problemática para el comercio y el consumo de este molusco. En efecto, cepas como *V. vulnificus*, *paraheamolyticus* *colerae* son cepas que pueden afectar la salud del consumidor en particular cuando el bivalvo es consumido “vivo” o “fresco”. Estudios adicionales deberían monitorear la evolución del conteo de estos patógenos oportunistas entre la extracción del animal y su posterior consumo que puede demorar hasta 10 días. En efecto es muy probable que la flora microbiana de los animales moribundos sea muy alterada en comparación con la flora original. Para ello, operaciones de “depuración” de bivalvos en ambientes controlados deberían ser realizadas previamente a la comercialización basándose en los modelos que se viene realizando en países desarrollados para especies con la ostra

## BIBLIOGRAFÍA

- Abanto, M., Martin, P., 2013. Evaluación de concha negra (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*) en los manglares de Puerto Pizarro, Tumbes - Perú, mediante un modelo de biomasa dinámica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Programa Cybertesis, Lima-Perú.
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 63–69. doi:10.1006/jipa.2000.4940
- Aranda, C.P., Valenzuela, C., Barrientos, J., Paredes, J., Leal, P., Maldonado, M., Godoy, F.A., Osorio, C.G., 2012. Bacteriostatic anti-*Vibrio parahaemolyticus* activity of *Pseudoalteromonas* sp. strains DIT09, DIT44 and DIT46 isolated from Southern Chilean intertidal *Perumytilus purpuratus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2365–2374. doi:10.1007/s11274-012-1044-z
- Battelle Memorial, I., 1994. Applied Biotechnology for Site Remediation. CRC Press.
- Beitil, C.M., 2010. Situación Socio-Ecológica de la Concha Prieta (*Anadara tuberculosa* y *A. similis*) en Ecuador y Recomendaciones. Informe Final Sobre los Resultados Preliminares de la Tesis Doctoral en Universidad de Georgia y Recomendaciones (Preinforme No. 1). Universidad de Georgia, Guayaquil-Ecuador.
- Berk, R.S., 1962. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA HEMOLYSIN. *J. Bacteriol.* 84, 1041–1048.
- Bivalve Anatomy (freshwater mussel), 2012.
- Blacio Game, E., 2002. Posibilidades de diversificación en la acuicultura ecuatoriana.
- Börjesson, L., n.d. The estrogen receptor in the freshwater pulmonate gastropod *Radix balthica*.
- Bruce Rodrigues, T., 2011. DIVERSIDADE METAGENÔMICA MICROBIANA DE DE BIOMAS TERRESTRES E MARINHOS (tesis). UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, Rio de Janeiro.
- Brucker, R.M., Bordenstein, S.R., 2013. The Hologenomic Basis of Speciation: Gut Bacteria Cause Hybrid Lethality in the Genus *Nasonia*. *Science* 341, 667–669. doi:10.1126/science.1240659
- Caballero, A.R., Moreau, J.M., Engel, L.S., Marquart, M.E., Hill, J.M., O'Callaghan, R.J., 2001. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV



- enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal. Biochem.* 290, 330–337. doi:10.1006/abio.2001.4999
- Campa-Córdova, A.I., Luna-González, A., Mazón-Suastegui, J.M., Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F., González-Ocampo, H.A., 2011. [Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae)]. *Rev. Biol. Trop.* 59, 183–191.
- Campos, J.A., Fournier, M.L., Soto, R., Arrion, R., 1990. Estimación de la población de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en Sierpe-Térraba, Costa Rica. *Rev Biol Trop* 38, 477–480.
- Cardinaud, M., Barbou, A., Capitaine, C., Bidault, A., Dujon, A.M., Moraga, D., Paillard, C., 2014. *Vibrio harveyi* Adheres to and Penetrates Tissues of the European Abalone *Haliotis tuberculata* within the First Hours of Contact. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6328–6333. doi:10.1128/AEM.01036-14
- Carlet, J., Cohen, J., Calandra, T., Opal, S.M., Masur, H., 2008. Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit. Care Med.* 36, 964–966. doi:10.1097/CCM.0B013E318165B886
- Cavalcanti, G.S., Gregoracci, G.B., dos Santos, E.O., Silveira, C.B., Meirelles, P.M., Longo, L., Gotoh, K., Nakamura, S., Iida, T., Sawabe, T., Rezende, C.E., Francini-Filho, R.B., Moura, R.L., Amado-Filho, G.M., Thompson, F.L., 2014. Physiologic and metagenomic attributes of the rhodoliths forming the largest CaCO<sub>3</sub> bed in the South Atlantic Ocean. *ISME J.* 8, 52–62. doi:10.1038/ismej.2013.133
- Chadwick, J.S., 1975. In vitro growth of bacteria in hemolymph of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 25, 331–335. doi:10.1016/0022-2011(75)90090-7
- Chandler, J.A., Turelli, M., 2014. Comment on “The hologenomic basis of speciation: Gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*.” *Science* 345, 1011–1011. doi:10.1126/science.1251997
- Cobeña, S., Alberto, E., 2014. “CULTIVO DE CONCHA PRIETA (*Anadara tuberculosa*) A DIFERENTES DENSIDADES EN PISCINAS CAMARONERAS UTILIZANDO ARTES DE CULTIVO” (Thesis).
- Colwell, R.R., Wicks, T.C., Tubiash, H.S., 1975. A comparative study of the bacterial flora of the hemolymph of *Callinectes sapidus*. *Mar Fish Rev* 37, 29–33.
- Craft, J.A., Gilbert, J.A., Temperton, B., Dempsey, K.E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchinson, T.H., Chipman, J.K., 2010. Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: Tissue-Specific Expression Patterns. *PLoS ONE* 5, e8875. doi:10.1371/journal.pone.0008875
- Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 1997. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 21, 357–365.
- Daubin, V., 2002. A Phylogenomic Approach to Bacterial Phylogeny: Evidence of a Core of Genes Sharing a Common History. *Genome Res.* 12, 1080–1090. doi:10.1101/gr.187002

- David, D.-C., Savini, D., 2011. Molecular approaches to bivalve population studies: a review. *Analele Stiintifice Ale Univ. Alexandru Ioan Cuza Din Iasi Sec II Genet. Si Biol. Mol.* 12, 1–13.
- Defer, D., Desriac, F., Henry, J., Bourgougnon, N., Baudy-Floc'h, M., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2013. Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: the bacterial connection. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1439–1447. doi:10.1016/j.fsi.2013.03.357
- Desriac, F., Le Chevalier, P., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C., Fleury, Y., 2014. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol. Lett.* 350, 107–116. doi:10.1111/1574-6968.12308
- Devine, S.P., Pelletreau, K.N., Rumpho, M.E., 2012a. 16S rDNA-Based Metagenomic Analysis of Bacterial Diversity Associated With Two Populations of the Kleptoplastic Sea Slug *Elysia chlorotica* and Its Algal Prey *Vaucheria litorea*. *Biol. Bull.* 223, 138–154.
- Devine, S.P., Pelletreau, K.N., Rumpho, M.E., 2012b. 16S rDNA-based metagenomic analysis of bacterial diversity associated with two populations of the kleptoplastic sea slug *Elysia chlorotica* and its algal prey *Vaucheria litorea*. *Biol. Bull.* 223, 138–154.
- Diringer, B., Vasquez, R., Moreno, V., Pretell, K., Sahuquet, M., 2012. Peru Project Studies Blood Cockles For Stock Enhancement, Aquaculture. *Glob. Aquac. Advocate* 40, 48–50.
- Dumbauld, B.R., Ruesink, J.L., Rumrill, S.S., 2009. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture* 290, 196–223. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.02.033
- Elizabeth M Glass, J.W., 2010. Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb.prot5368. doi:10.1101/pdb.prot5368
- Epple, H.J., Mankertz, J., Ignatius, R., Liesenfeld, O., Fromm, M., Zeitz, M., Chakraborty, T., Schulzke, J.D., 2004. *Aeromonas hydrophila* Beta-Hemolysin Induces Active Chloride Secretion in Colon Epithelial Cells (HT-29/B6). *Infect. Immun.* 72, 4848–4858. doi:10.1128/IAI.72.8.4848-4858.2004
- Faury, N., Saulnier, D., Thompson, F.L., Gay, M., Swings, J., Roux, F.L., 2004. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2137–2140. doi:10.1099/ijs.0.63232-0
- Fischer, W., Organizació de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació, 1995. *Pacífico Centro-Oriental: guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca*. FAO, Roma.
- Flores, D., Perú. Ministerio del Ambiente. Instituto Geofísico del Perú, 2013. *Identificación de servicios ecosistémicos en el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes: Informe técnico especial*. IGP, Lima.

- Flores, L., 2010. Tasa de crecimiento de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Bivalvia: Arcidae) en la reserva ecológica manglares Cayapas-Mataje (REMACAM): Un análisis basado en sistemas de cajas suspendidas. Growth rate of *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Bivalvia: Arcidae) at the Cayapas-Mataje ecological mangrove reserve (REMACAM): a suspended cage based analysis.
- Froelich, B., Oliver, J.D., 2013. The Interactions of *Vibrio vulnificus* and the Oyster *Crassostrea virginica*. *Microb. Ecol.* 65, 807–816. doi:10.1007/s00248-012-0162-3
- GALDAMEZ CASTILLO, A.M., PACHECO REYES, S.P., PEREZ GARCIA, I.M., KINO, S., 2007. Guía para la producción de *Anadara* spp. 2006-2007: producción artificial de semilla, cultivo intermedio y cultivo de *Anadara tuberculosa* y *A. grandis*. (Guía). JICA/MAG-CENDEPESCA, El Salvador.
- García-Domínguez, F.A., De Haro-Hernández, A., García-Cuellar, Á., Villalejo-Fuerte, M., Rodríguez-Astudillo, S., 2008. Ciclo reproductivo de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Arcidae) en Bahía Magdalena, México. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43, 143–152. doi:10.4067/S0718-19572008000100015
- Gibson, L.F., 1998. Bacteriocin activity and probiotic activity of *Aeromonas media*. *J. Appl. Microbiol.* 85 Suppl 1, 243S–248S. doi:10.1111/j.1365-2672.1998.tb05304.x
- Gilbert, J.A., Steele, J.A., Caporaso, J.G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., Huse, S., McHardy, A.C., Knight, R., Joint, I., Somerfield, P., Fuhrman, J.A., Field, D., 2012. Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J.* 6, 298–308. doi:10.1038/ismej.2011.107
- Glasoe, S., Christy, A., 2003. Coastal urbanization and microbial contamination of shellfish growing areas (Literature review and an alysis No. PSAT04-09). Puget Sound Action Team, Olympia, Washington.
- Golbang, N., Burnie, J.P., Klapper, P.E., Bostock, A., Williamson, P., 1996. Sensitive and universal method for microbial DNA extraction from blood products. *J. Clin. Pathol.* 49, 861–863.
- Gomez-Chiarri, M., 2012. A Review of “Aquaculture and Fisheries Biotechnology, Genetic Approaches, 2nd Edition.” *Rev. Fish. Sci.* 20, 183–183. doi:10.1080/10641262.2012.707103
- Green, C.M., Tracy, P.T., 2013. Fostering Shellfish Aquaculture Production in Maryland and Other States (No. Office of Policy Analysis). Department of Legislative Services, Annapolis, Maryland.
- Iqbal, A., Azim, M.K., Hashmi, N., Ali, S.A., Musharaf, S.G., 2011. Structural characterization of metalloprotease vibriolysin of cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Protein Pept. Lett.* 18, 287–294.
- Johnson, J.I., Kavanaugh, S.I., Nguyen, C., Tsai, P.-S., 2014. Localization and Functional Characterization of a Novel Adipokinetic Hormone in

- the Mollusk, *Aplysia californica*. PLoS ONE 9. doi:10.1371/journal.pone.0106014
- Johnson, M.K., Boese-Marrazzo, D., 1980. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 29, 1028–1033.
- Jordán, L.Y., Gómez, J.A., 2006. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE *Anadara tuberculosa*, GOLFO DE MONTIJO, REPÚBLICA DE PANAMÁ. Tecnociencia 8, 191–205.
- Jorquera, M.A., Riquelme, C.E., Loyola, L.A., Muñoz, L.F., 2000. Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*. Aquac. Int. 7, 433–448. doi:10.1023/A:1009246007208
- Karim, M., Zhao, W., Rowley, D., Nelson, D., Gomez-Chiarri, M., 2013. Probiotic Strains for Shellfish Aquaculture: Protection of Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, Larvae and Juveniles Against Bacterial Challenge. J. Shellfish Res. 32, 401–408. doi:10.2983/035.032.0220
- Kent, W.J., 2002. BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. Genome Res. 12, 656–664. doi:10.1101/gr.229202
- King, G.M., Judd, C., Kuske, C.R., Smith, C., 2012. Analysis of Stomach and Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from Coastal Louisiana, USA. PLoS ONE 7, e51475. doi:10.1371/journal.pone.0051475
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.-L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. Microbes Infect. Inst. Pasteur 8, 2715–2724. doi:10.1016/j.micinf.2006.07.020
- Lomas, E., Caranqui, J., Espinoza, L., Corría, R., 2011. PLAN DE EVALUACIÓN Y MANEJO DEL CANGREJO ROJO (*Ucides occidentalis*) Y CONCHA NEGRA (*Anadara similis* Y *Anadara tuberculosa*) EN LOS MANGLARES DE LA COSTA ECUATORIANA.
- Longeon, A., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Corre, S., Nicolas, J.-L., Guyot, M., 2004. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. Mar. Biotechnol. N. Y. N 6, 633–641. doi:10.1007/s10126-004-3009-1
- Mao, Y., Zhou, C., Zhu, L., Huang, Y., Yan, T., Fang, J., Zhu, W., 2013. Identification and expression analysis on bactericidal permeability-increasing protein (BPI)/lipopolysaccharide-binding protein (LBP) of ark shell, *Scapharca broughtonii*. Fish Shellfish Immunol. 35, 642–652. doi:10.1016/j.fsi.2013.05.025
- Martinez Cruz, P., Ibanez, A.L., Monroy Hermosillo, O.A., Ramirez Saad, H.C., 2012. Use of Probiotics in Aquaculture. ISRN Microbiol. 2012. doi:10.5402/2012/916845

- Medina, P., René, D., 2005. Biología reproductiva de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en el estero Santo Domingo, B.C.S., México. (Thesis). Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- MedlinePlus en español [WWW Document], n.d. URL <http://vsearch.nlm.nih.gov/vivisimo/cgi-bin/query-meta?v%3Aproject=medlineplus-spanish&query=Sepsis> (accessed 5.13.15).
- Mersni Achour, R., Imbert, N., Huet, V., Cheikh, Y.B., Faury, N., Doghri, I., Rouatbi, S., Bordenave, S., Travers, M.-A., Saulnier, D., Fruitier-Arnaudin, I., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2014.09.006
- Miyoshi, S.-I., Wang, J., Katoh, K., Senoh, M., Mizuno, T., Maehara, Y., 2012. An extracellular serine protease produced by *Vibrio vulnificus* NCIMB 2137, a metalloprotease-gene negative strain isolated from a diseased eel. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1633–1639. doi:10.1007/s11274-011-0969-y
- Miyoshi, S., Nitanda, Y., Fujii, K., Kawahara, K., Li, T., Maehara, Y., Ramamurthy, T., Takeda, Y., Shinoda, S., 2008. Differential gene expression and extracellular secretion of the collagenolytic enzymes by the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 283, 176–181. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01159.x
- Mizuno, T., Nanko, A., Maehara, Y., Shinoda, S., Miyoshi, S.-I., 2014. A novel extracellular protease of *Vibrio mimicus* that mediates maturation of an endogenous hemolysin. *Microbiol. Immunol.* 58, 503–512. doi:10.1111/1348-0421.12177
- Mukherjee, S., Barman, S., Mandal, N.C., Bhattacharya, S., 2014. Antibacterial activity of *Achatina* CRP and its mechanism of action. *Indian J. Exp. Biol.* 52, 692–704.
- National Center for Biotechnology, Pike, U.S.N.L. of M. 8600 R., MD, B., Usa, 20894, n.d. NCBI - MESH - Taxones del reino Protista [WWW Document]. Taxones Protista. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68001419> (accessed 5.14.15).
- Novitskaya, V.N., Soldatov, A.A., 2013. Peculiarities of Functional Morphology of Erythroid Elements of Hemolymph of the Bivalve Mollusk *Anadara inaequalis*, the Black Sea. *Hydrobiol. J.* 49, 64–71. doi:10.1615/HydrobJ.v49.i6.60
- Ogara, W.O., Nyang'wara, A.O., Abiya, I., 2002. Review Article: Biotechnology in aquaculture. *J. Aquat. Sci.* 17, 150–156. doi:10.4314/jas.v17i2.19932
- Olafsen, J.A., Mikkelsen, H.V., Giæver, H.M., Høvik Hansen, G., 1993. Indigenous Bacteria in Hemolymph and Tissues of Marine Bivalves at Low Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1848–1854.

- Ołdak, E., Trafny, E.A., 2005. Secretion of Proteases by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3281–3288. doi:10.1128/AAC.49.8.3281-3288.2005
- Ortíz, E., Uría, E., Olivares, A.S., Tsutsumi, V., Shibayama, M., 2003. Estudio de la ultraestructura de la espermatogénesis de *Anadara tuberculosa* (Sowerbi 1833) (Mollusca: Pelecipoda:Arcidae) [WWW Document]. *Hidrobiológica*. URL <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=57813209> (accessed 10.10.14).
- Peng, X., Yu, K.-Q., Deng, G.-H., Jiang, Y.-X., Wang, Y., Zhang, G.-X., Zhou, H.-W., 2013. Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags. *J. Microbiol. Methods* 95, 455–462. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.015
- Prado, S., Romalde, J.L., Barja, J.L., 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Vet. Microbiol.* 145, 187–197. doi:10.1016/j.vetmic.2010.08.021
- Provorov, N.A., Tikhonovich, I.A., 2014. [Super-species genetic systems]. *Zhurnal Obshchei Biol.* 75, 247–260.
- Purohit, M.K., Singh, S.P., 2009. Assessment of various methods for extraction of metagenomic DNA from saline habitats of coastal Gujarat (India) to explore molecular diversity. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 338–344. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02663.x
- Qi, Z., Zhang, X.-H., Boon, N., Bossier, P., 2009. Probiotics in aquaculture of China — Current state, problems and prospect. *Aquaculture* 290, 15–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.02.012
- Reynoso-Granados, T., Monsalvo-Spencer, P., Saucedo, P.E., Mazón-Suástegui, J.M., Robles-Mungaray, M., 2012. Settlement and Early Nursery of Juvenile *Anadara grandis* (Pelecypoda: Arcidae) Under Different Conditions at the Hatchery and Ponds. *J. Shellfish Res.* 31, 769–775. doi:10.2983/035.031.0321
- Rodrigues, S., Paillard, C., Dufour, A., Bazire, A., 2015. Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 Against *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, 45–51. doi:10.1007/s12602-014-9173-3
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., Zilber-Rosenberg, I., 2007. The hologenome theory disregards the coral holobiont: reply from Rosenberg et al. *Nat. Rev. Microbiol.* 5. doi:10.1038/nrmicro1635-c2
- Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2011. Symbiosis and development: The hologenome concept. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 93, 56–66. doi:10.1002/bdrc.20196
- Rosselló-Mora, R., 2005. El concepto de especie en Procariotas. *Rev. Ecosistemas* 14.
- Sahilah, A.M., Laila, R. a. S., Sallehuddin, H.M., Osman, H., Aminah, A., Ahmad Azuhairi, A., 2014. Antibiotic resistance and molecular typing among cockle (*Anadara granosa*) strains of *Vibrio parahaemolyticus*

- by polymerase chain reaction (PCR)-based analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 649–659. doi:10.1007/s11274-013-1494-y
- Sahu, M.K., Swarnakumar, N.S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L., 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian J. Microbiol.* 48, 299–308. doi:10.1007/s12088-008-0024-3
- Salazar, J., Blacio, E., 2002. Reproducción inducida de concha prieta (*Anadara tuberculosa*).
- Sayamov, S.R., Monakhova, E.V., Fedorenko, G.M., Tkacheva, T.I., Markina, O.V., Alekseeva, L.P., Pisanov, R.V., Bardakhchian, E.A., 2012. Ultrastructural changes in cultured cells under the effect of *Vibrio Cholerae* hemagglutinin/protease. *Bull. Exp. Biol. Med.* 152, 456–460.
- Schefold, J.C., Hasper, D., Reinke, P., Monneret, G., Volk, H.-D., 2008. Consider delayed immunosuppression into the concept of sepsis. *Crit. Care Med.* 36, 3118. doi:10.1097/CCM.0b013e31818bdd8f
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
- Scott, A.P., 2012. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects. *Steroids* 78. doi:10.1016/j.steroids.2012.11.006
- Scott, J.R., Thune, R.L., 1986. Bacterial flora of hemolymph from red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard), from commercial ponds. *Aquaculture* 58, 161–165. doi:10.1016/0044-8486(86)90081-5
- Sharpton, T.J., 2014. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Plant Genet. Genomics* 5, 209. doi:10.3389/fpls.2014.00209
- Shinoda, S., 2005. [Pathogenic factors of vibrios with special emphasis on *Vibrio vulnificus*]. *Yakugaku Zasshi* 125, 531–547.
- Shinoda, S., Miyoshi, S.-I., 2011. Proteases produced by vibrios. *Biocontrol Sci.* 16, 1–11.
- Singh, Y., Ahmad, J., Musarrat, J., Ehtesham, N.Z., Hasnain, S.E., 2013. Emerging importance of holobionts in evolution and in probiotics. *Gut Pathog.* 5, 12. doi:10.1186/1757-4749-5-12
- Sonoda, H., Daimon, K., Yamaji, H., Sugimura, A., 2009. Efficient production of active *Vibrio proteolyticus* aminopeptidase in *Escherichia coli* by co-expression with engineered vibriolysin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 191–198. doi:10.1007/s00253-009-2089-2
- Suyama, M., Bork, P., 2001. Evolution of prokaryotic gene order: genome rearrangements in closely related species. *Trends Genet. TIG* 17, 10–13.

- Tamames, J., 2001. Evolution of gene order conservation in prokaryotes. *Genome Biol.* 2, research0020. doi:10.1186/gb-2001-2-6-research0020
- Travers, M.-A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.-L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T., Fruitier-Arnaudin, I., Saulnier, D., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2014.04.009
- Tubiash, H.S., Sizemore, R.K., Colwell, R.R., 1975. Bacterial flora of the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*: most probable numbers. *Appl. Microbiol.* 29, 388–392.
- Tufts, D.M., Bextine, B., 2009. Identification of Bacterial Species in the Hemolymph of Queen *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.* 38, 1360–1364. doi:10.1603/022.038.0502
- Vo, A.-T.E., Jedlicka, J.A., 2014. Protocols for metagenomic DNA extraction and Illumina amplicon library preparation for faecal and swab samples. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 1183–1197. doi:10.1111/1755-0998.12269
- Vuddhakul, V., Soboon, S., Sunghiran, W., Kaewpiboon, S., Chowdhury, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., 2006. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in three molluscan shellfish species (*Meretrix meretrix*, *Perna viridis*, and *Anadara granosa*) and their association with foodborne disease in southern Thailand. *J. Food Prot.* 69, 2615–2620.
- Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M.A.C., Caldeira, R., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., 2003. Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1048–1054. doi:10.1128/JCM.41.3.1048-1054.2003
- Wang, J., Kalyan, S., Steck, N., Turner, L.M., Harr, B., Künzel, S., Vallier, M., Häslér, R., Franke, A., Oberg, H.-H., Ibrahim, S.M., Grassl, G.A., Kabelitz, D., Baines, J.F., 2015. Analysis of intestinal microbiota in hybrid house mice reveals evolutionary divergence in a vertebrate hologenome. *Nat. Commun.* 6, 6440. doi:10.1038/ncomms7440
- Wang, X.-W., Xu, J.-D., Zhao, X.-F., Vasta, G.R., Wang, J.-X., 2014. A Shrimp C-type Lectin Inhibits Proliferation of the Hemolymph Microbiota by Maintaining the Expression of Antimicrobial Peptides. *J. Biol. Chem.* 289, 11779–11790. doi:10.1074/jbc.M114.552307
- Wendling, C.C., Batista, F.M., Wegner, K.M., 2014. Persistence, Seasonal Dynamics and Pathogenic Potential of *Vibrio* Communities from Pacific Oyster Hemolymph. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0094256
- Wu, G.D., Lewis, J.D., Hoffmann, C., Chen, Y.-Y., Knight, R., Bittinger, K., Hwang, J., Chen, J., Berkowsky, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F.D., 2010. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing



- bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol.* 10, 206. doi:10.1186/1471-2180-10-206
- Wuthiekanun, V., Smith, M.D., Dance, D.A., Walsh, A.L., Pitt, T.L., White, N.J., 1996. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Med. Microbiol.* 45, 408–412.
- Yingkajorn, M., Sermwitayawong, N., Palittapongarnpim, P., Nishibuchi, M., Robins, W.P., Mekalanos, J.J., Uddhakul, V., 2014. *Vibrio parahaemolyticus* and its specific bacteriophages as an indicator in cockles (*Anadara granosa*) for the risk of *V. parahaemolyticus* infection in Southern Thailand. *Microb. Ecol.* 67, 849–856. doi:10.1007/s00248-014-0382-9
- Yousr, A.H., Napis, S., Ali, R., Rusul, G., Radu, S., 2007. Detection of aerolysin and hemolysin genes in *Aeromonas* spp. isolated from environmental and shellfish sources by polymerase chain reaction. *ASEAN Food J.* 14, 115–122.
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 723–735. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x

## **ANEXOS**



**Ilustración 33** Disección bilateral de la Concha negra. Flecha negra, biseras y estómago. Flecha roja: músculo adubtor y parte del pié.



**Ilustración 34** Disección y extracción de muestra de estómago de Concha negra.



**Ilustración 35** Buffer de lisis en la extracción de DNA.



**Ilustración 36** Centrífuga de programación digital.



**Ilustración 37** Centrifugación de la suspensión de DNA.



**Ilustración 38** Migración de ADN por gel de agarosa al 2%.

**Tabla 11** Base de datos de reportes de bacterias segun sus características y propiedades en el metagenoma de la Concha negra.

Species	abundance	avg % ident	avg align len	Culture	Medio	virulence
Unclassified	63350			Unknow		
Vibrio parahaemolyticus	6581	97.61	236	Cultured	TCBS	Pathogen
Mangroveibacter plantisponsor	1775	165.7	270	Uncultured		Non pathogen
Vibrio vulnificus	1414	133.91	289	Cultured	TCBS	Pathogen
Vibrio alginolyticus	920	129.43	239.8	Cultured	TCBS	Pathogen
Vibrio cholerae	609	97.47	198	Cultured	TCBS	Pathogen
Cytophaga fermentans	160	149.69	101.81	Uncultured		Unknow
Mycoplasma mobile	142	133.33	76.97	Cultured	Unknow	Pathogen
Vibrio aestuarianus	71	109.76	286	Cultured	TCBS	Pathogen
Vibrio sp.	70	100	134.8	Cultured	TCBS	Non Pathogen
Vibrio harveyi	65	98.43	156.99	Cultured	TCBS	Pathogen
Enterococcus canis	57	100	68	Cultured	Blood agar	Pathogen
Synechococcus sp. WH 7803	48	135.86	367	Cultured	Broth	Non pathogen
Marinobacterium stanieri	38	100	85	Unknow		
Vibrio harveyi	29	194.75	377	Cultured	TCBS	Pathogen
Frankia sp.	21	100	57	Cultured	Unknow	Non pathogen
Vibrio sp.	21	100	121.67	Cultured	TCBS	Pathogen
Vibrio sp.	21	100	135	Cultured	TCBS	Pathogen
Mycoplasma pulmonis	19	100	50	Cultured	Unknow	Pathogen
Capnocytophaga canimorsus	15	142.74	82	Cultured	Blood agar	Pathogen
Flammeovirga aprica	13	97.81	114	Cultured	Marine agar	Non pathogen
uncultured bacterium	10	102.18	119.7	Uncultured		Unknow
Synechococcus sp. UBR	7	149.1	333	Cultured	Broth	Non pathogen
Pseudomonas plecoglossicida	6	200	100	Cultured	Marine agar	Non Pathogen
Stenotrophomonas maltophilia	5	124.65	293	Cultured	Blood agar	Pathogen
uncultured marine microorganism	5	133.6	213.4	Uncultured		Unknow
Ilyobacter tartaricus	4	899.47	1701	Uncultured		Non pathogen
Vibrio harveyi	4	97.86	140	Cultured	TCBS	Pathogen
Clostridium bifermentans	3	156.31	223.67	Cultured	Marine agar	Non pathogen
Ruminococcus flavefaciens	3	100	50	Uncultured		Non pathogen
Veillonella dispar	3	100	63	Cultured	Marine agar	Non pathogen

Candidatus Wolbachia inokumae	2	100	52	Uncultured		Unknow
Flavobacterium johnsoniae	2	100	196	Cultured	Blood agar	Pathogen
Reinekea blandensis	2	69.98	46.5			
Thermus sp. YBJ-1	2	98.17	218	Cultured	Unknow	Non pathogen
uncultured alpha proteobacterium	2	99.18	93	Uncultured		Unknow
Vibrio sp. BFLP-10	2	97.75	223	Cultured	TCBS	Pathogen
Vibrio splendidus	2	198.44	132	Cultured	TCBS	Pathogen
Acetobacter pasteurianus	1	131.14	244	Cultivable	Unknow	
Agrobacterium tumefaciens	1	117.2	310	Cultivable	Marine agar	Non pathogen
Atopostipes suicloacalis	1	100	121	Uncultured		
Burkholderia thailandensis	1	97.65	213	Cultured	Blood agar	Pathogen
Campylobacter sp.	1	91.3	207	Cultured	Blood agar	Pathogen
Capnocytophaga gingivalis	1	112.5	57	Cultured	Blood agar	Pathogen
Chthoniobacter flavus	1	100	55	Uncultured		Unknow
Fibrobacter intestinalis	1	159.61	85	Cultured	Unknow	Unknow
Flammeovirga yaeyamensis	1	119.6	241	Cultured	Marine agar	Non pathogen
Flavobacterium branchiophilum	1	1687.83	2539	Cultured	Blood agar	Pathogen
Flavobacterium sp. S1	1	696.05	533	Cultured	Blood agar	Pathogen
Fusobacterium mortiferum	1	149.02	76	Cultured	Blood agar	Pathogen
Geobacillus stearothermophilus	1	98.67	267	Cultured	Marine agar	Non pathogen
Glaciecola sp. HTCC2999	1	259.65	147	Uncultured		Unknow
Globicatella sulfidifaciens	1	100	252			Pathogen
Lactobacillus brevis	1	133.33	352	Cultured	Marine agar	Non pathogen
Marinobacter algicola	1	89.45	199	Uncultured		Non pathogen
Marinoscillum furvescens	1	99.12	113	Uncultured		
Mesoplasma florum	1	68.29	41	Cultured		
Micrococcus luteus	1	123.88	276	Cultured		Pathogen
Photobacterium damsela	1	117.65	136	Cultured	Marine agar	
Piscirickettsia salmonis	1	100	53	Uncultured		Pathogen
Planctomyces maris	1	100	50	Unknow		
Prochlorothrix hollandica	1	120.64	168	Unknow		Non pathogen
Pseudoalteromonas sp. 'A4 isolate-1'	1	117.65	269	Cultured	Marine agar	Probiotic
Rhodopirellula sp. SM49	1	99.62	262	Uncultured		Unknow
Robiginitalea biformata	1	100	72	Uncultured		
rumen bacterium NK3B85	1	100	66	Uncultured		Pathogen
Saccharophagus degradans	1	87.93	116	Uncultured		Non pathogen

Salipiger mucosus	1	105.13	212	Uncultured		Non pathogen
Solemya velum gill symbiont	1	182.42	182	Uncultured		Non pathogen
Synechococcus sp. MA0607	1	139.48	229	Cultured	Broth	Non pathogen
Tenacibaculum maritimum	1	100	76	Cultured	Marine agar	Non pathogen
Teredinibacter turnerae	1	100	87	Uncultured		Unknow
Truepera radiovictrix	1	250	147	Uncultured		Unknow
uncultured delta proteobacterium	1	100	51	Uncultured		Unknow
uncultured gamma proteobacterium	1	99.21	253	Uncultured		Unknow
unidentified marine eubacterium	1	99.61	259	Unknow		
unidentified sulfate-reducing bacterium	1	100	73	Unknow		

---