



**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DEL CÓDIGO DE BARRAS
MOLECULARES 16S DE BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A LAS
ENFERMEDADES DEL CAMARÓN *Litopenaeus vannamei***

Previa a la obtención del Título de: BIÓLOGO

AUTOR:

TERÁN SALAZAR NAHOMY ALEXANDRA

TUTOR:

Ac. SONNYA MENDOZA LOMBANA Ph.D

PERÍODO

2024

**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DEL CÓDIGO DE BARRAS
MOLECULARES 16S DE BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A LAS
ENFERMEDADES DEL CAMARÓN *Litopenaeus vannamei***

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

AUTOR:

TERÁN SALAZAR NAHOMY ALEXANDRA

TUTOR:

Ac. SONNYA MENDOZA LOMBANA Ph.D

PERÍODO

2024

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “Aislamiento y análisis del código de barras moleculares 16s de bacterias patógenas asociadas a las enfermedades del camarón *Litopenaeus vannamei*”, elaborado por Terán Salazar Nahomy Alexandra, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo/a, me permito declarar que el trabajo ha sido acogido a las sugerencias de los docentes revisores especialistas, luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes.

Atentamente



Ac. Sonnya Mendoza Lombana, Ph.D.

DOCENTE TUTOR

C.I.0912802816

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “Aislamiento Y Análisis Del Código De Barras Moleculares 16s De Bacterias Patógenas Asociadas A Las Enfermedades Del Camarón *Litopenaeus Vannamei*”, elaborado por Terán Salazar Nahomy Alexandra., estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



Blga. Dennis Tomalá Solano M.Sc

DOCENTE DE ÁREA

DECLARACIÓN EXPRESA

El presente trabajo de Titulación o Graduación “Aislamiento Y Análisis Del Código De Barras Moleculares 16s De Bacterias Patógenas Asociadas A Las Enfermedades Del Camarón *Litopenaeus Vannamei*”. La responsabilidad por las ideas, hechos, investigaciones y resultados expuestos en esta tesis, pertenece exclusivamente al autor, y el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



Nahomy Terán Salazar

C.I. 0929952125

DEDICATORIA

A Dios, el creador del universo, por brindarme la oportunidad de existir y por guiar mis pasos en la vida.

A mis padres, quienes me han dado su amor incondicional, me han apoyado en todo momento y me han enseñado los valores que me han forjado como persona.

A mis abuelos, quienes con su sabiduría y experiencia de vida han sido una fuente de inspiración y fortaleza para mí. Agradezco profundamente los consejos y el cariño que me han brindado.

Esta dedicatoria es un humilde pero sincero tributo a aquellos que han marcado mi vida de manera tan profunda. Les agradezco de corazón por ser pilares fundamentales en mi existencia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a Dios, por brindarme salud, fortaleza, su guía y protección han sido fundamentales en cada paso que he dado.

Agradezco de manera especial a mis padres, quienes han sido mi mayor apoyo y fuente inagotable de amor. Su constante sacrificio y dedicación han sido esenciales para mi desarrollo académico y personal.

A mi abuela Adriana, por su sabiduría, amor y paciencia. Agradezco profundamente su presencia y sus consejos, que siempre han sido un faro en mi camino.

A mi tía Geomara, estoy inmensamente agradecido por su apoyo y cariño constante.

Y expresé mi profundo agradecimiento a la Dra. Sonnya Mendoza, cuya creatividad y guía han sido pilares en este proyecto. Su experiencia, conocimientos y dedicación han sido invaluable. Gracias por brindarme su orientación paso a paso y por inspirarme a dar lo mejor de mí en cada etapa de este trabajo.

Al Dr. Efrén Santos, agradezco su vasto conocimiento y su guía experta, su disposición para compartir sus conocimientos para la realización de este proyecto.

A Daniel Campozano, le agradezco su presencia constante, sus palabras de aliento y los esfuerzos constantemente realizados para contribuir al éxito de este proyecto.

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

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **TERÁN SALAZAR NAHOMY ALEXANDRA** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 17 de julio del 2024.



Ing. Jimmy Véliz Moreno, M.Sc.
DIRECTOR/A DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Blga. Dennis Tomalá Solano M.Sc.
PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Ac. Sonnya Mendoza Lombana, Ph.D.
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blgo. Richard Duque Marín, M.Sc.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lcdo. Pascual Roca-Silvestre, Mgtr.
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR	I
DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA	II
DECLARACIÓN EXPRESA	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE ANEXOS.....	X
ABREVIATURAS	XI
Resumen.....	XIII
Abstract	XIV
Capítulo I.....	- 1 -
1.1. Introducción	- 1 -
1.2. Problemática.....	- 3 -
1.3. Justificación.....	- 4 -
1.4. Objetivos	- 5 -
1.4.1. Objetivo general	- 5 -
1.4.2. Objetivos específicos	- 5 -
1.5. Hipótesis.....	- 5 -
Capítulo II	- 6 -
2.1. Marco Teórico.....	- 6 -
2.1.1. Acuicultura del camarón y su importancia.....	- 6 -
2.1.2. Enfermedades bacterianas en la acuicultura del camarón.	- 6 -
2.1.2.1. Vibriosis.....	- 7 -
2.1.2.2. Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP)	- 7 -
2.1.2.3. AHPND.....	- 8 -
2.2.1. Métodos de diagnóstico de bacterias patógenas en camarones <i>Penaeidos</i> . -	- 9 -

2.2.2. Métodos fenotípicos	- 9 -
2.2.2.1. Características morfológicas.....	- 10 -
2.2.2.2. Pruebas bioquímicas	- 10 -
2.3. Genoma Bacteriano de los vibrios.....	- 11 -
2.3.1. Métodos moleculares.....	- 12 -
2.3.1.1. Extracción de ADN.....	- 12 -
2.3.1.2. Método de NaCl.....	- 12 -
2.3.1.3. Método de CTAB.....	- 12 -
2.3.1.4. Método de fenol-cloroformo.....	- 13 -
2.3.1.5. Kit de extracción basado en perlas magnéticas	- 14 -
2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	- 15 -
2.4.1. Partidores 8F y 1492R.....	- 16 -
2.5. Secuenciación de la región conservada del gen <i>ARNr 16S</i>	- 16 -
2.5.1. Secuenciación de Sanger	- 17 -
2.5.2. Secuenciación por síntesis (Illumina)	- 17 -
2.5.3. Secuenciación de Nanoporos	- 18 -
2.6. Herramientas bioinformáticas	- 19 -
2.6.1. BLAST.....	- 19 -
2.6.2. NCBI.....	- 19 -
2.6.3. MEGA X.....	- 20 -
Capítulo III.....	- 20 -
3.1. Área de estudio.....	- 20 -
3.2. Muestreo.....	- 21 -
3.2.1. Siembra y aislamiento.....	- 22 -
3.2.2. Criopreservación de bacterias.....	- 22 -
3.3. Extracción y purificación del ADN.....	- 23 -
3.4. Cuantificación del ADN.....	- 26 -
3.5. Amplificación del ADN bacteriano.....	- 26 -
3.7. Secuenciación del <i>ARNr 16S</i>	- 28 -
3.8. Análisis estadístico	- 28 -

Capítulo IV	- 29 -
4.1 Resultados	- 29 -
4.1.2. Extracción del ADN bacteriano.....	- 29 -
4.1.3. Amplificación por PCR del gen <i>ARNr 16S</i>	- 29 -
4.1.4. Identificación de aislados bacterianos	- 34 -
4.1.5. Análisis filogenético	- 41 -
Capítulo V	- 53 -
5.1. Discusiones	- 53 -
5.2. Conclusiones	- 58 -
5.3. Recomendaciones.....	- 60 -
5.5. Anexos.....	- 71 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte histopatológico AHPND	- 9 -
Figura 2. Genoma circular de <i>Vibrio harveyi</i> 345	- 11 -
Figura 3. Sistema de perlas magnética en la extracción de ADN	- 14 -
Figura 4. Ubicación geográfica.....	- 21 -
Figura 5. Protocolo de extracción de ADN.....	- 25 -
Figura 6. Migraciones del producto PCR, muestras 1-10.....	- 30 -
Figura 7. Migraciones del producto PCR, muestras 10-20.....	- 30 -
Figura 8. Migraciones del producto PCR, muestras 21-59	- 31 -
Figura 9. Migraciones del producto PCR, muestras 66-79.....	- 32 -
.....	- 32 -

Figura 10. Migraciones del producto PCR, muestras 80-96 y repeticiones de 71 y 79.	- 33 -
Figura 11. Número de bacterias identificadas en las zonas productivas de Guayas y Santa Elena.....	- 35 -
Figura 12. Identificación bacteriana en la zona de Yaguachi.	- 36 -
Figura 13. Identificación bacteriana en la zona de Santa Elena.....	- 37 -
Figura 14. Identificación bacteriana en la zona de Taura.	- 38 -
Figura 15. Identificación bacteriana en la zona del Morro.	- 39 -
Figura 16. Identificación bacteriana en la zona de Sabana Grande.	- 40 -
Figura 17. Árbol filogenético de bacterias en la zona de Yaguachi.....	- 42 -
Figura 18. Árbol filogenético de bacterias en la zona de Santa Elena.	- 44 -
Figura 19. Árbol filogenético de bacterias en la zona de Taura.....	- 46 -
Figura 20. Árbol filogenético de bacterias en la zona del Morro.....	- 48 -
Figura 21. Árbol filogenético de bacterias en la zona de Sabana Grande.....	- 50 -
Figura 22. Árbol filogenético de las cinco zonas productivas	- 52 -

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento de colonias en agar TSA.	- 71 -
Anexo 2. Extracción de ADN empleando un kit.....	- 71 -
Anexo 3. Cuantificación de extracciones ADN en Nanodrop.	- 72 -

Anexo 4. Empleo del GoTaq para la ejecución de la PCR.	- 75 -
Anexo 5. Migraciones de pb en la cámara de electroforesis.....	- 75 -
Anexo 6. Tabla de Identificación Bacteriana en el BLAST.....	- 76 -

ABREVIATURAS

aHL: alfa-hemolisina

AHPND: Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda

API: Índice de perfil analítico

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local

CTAB: Bromuro de Cetiltrimetilamonio

ddNTPs: Dideoxinucleótidos

dNTPs: Trifosfatos de Desoxirribonucleósidos

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EMS: Síndrome de Mortalidad Temprana

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

NHP: Hepatopancreatitis Necrotizante

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SBS: Secuenciación por Síntesis

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

TAE: Tampón de Tris-Acetato-EDTA

TCBS - Agar de Sales Biliares Citrato Tiosulfato

TSB: Caldo Soja Tripticaseína

Tris-HCl: Trisaminometano clorhidrato

TSA: Agar de Soya Tripticasa

WN: Solución de Lavado

Resumen

Ecuador lidera la exportación de camarón blanco, una industria que comenzó en los años 70 y ha crecido adoptando tecnologías avanzadas. La producción enfrenta desafíos por enfermedades bacterianas como vibriosis, NHP y AHPND, subrayando la importancia de comprender las comunidades bacterianas en los cultivos para mejorar su manejo. El presente estudio tiene como objetivo principal identificar bacterias patógenas mediante la secuenciación de la región del gen que codifica el ARN ribosomal 16S en zonas productivas de camarón en las provincias del Guayas y Santa Elena, Ecuador. Se recolectaron muestras de larvas y camarones enfermos en cinco zonas, en el Laboratorio Duloder S.A. se realizó el aislamiento de bacterias mediante cultivos en agar selectivo. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción y purificación del ADN mediante el kit Norgen Biotek, asegurando la calidad y pureza del ADN extraído. La región del gen *ARNr 16S* se amplificó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores universales 8F y 1492 R. Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando el método de Sanger. El análisis bioinformático del BLAST de las secuencias obtenidas permitió identificar 18 géneros diferentes de bacterias, entre los más abundantes fueron *Staphylococcus* (21,88%), *Bacillus* (20,83%) y *Vibrio* (19,79%). Los géneros asociados a patogenicidad incluyeron *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Shewanella* conocidas por causar enfermedades infecciosas en el sector. Además, se detectaron bacterias oportunistas y poco comunes, relacionadas a posible contaminación antropogénica en afluentes cercanos de estanques camaroneros, como *Gulosibacter faecalis*, *Listeria grayi*, *Morganella sp.* Los árboles filogenéticos fueron construidos empleando el software MEGA X para analizar la relación y evolución de las bacterias. El estudio denotó la importancia de implementar técnicas avanzadas de diagnóstico molecular para mejorar la salud y el manejo de los cultivos de camarón.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, bacterias patógenas, *ARNr 16S*, secuenciación, análisis filogenético, acuicultura

Abstract

Ecuador leads the export of white shrimp, an industry that began in the 1970s and has grown by adopting advanced technologies. Production faces challenges from bacterial diseases such as Vibriosis, NHP, and AHPND, highlighting the importance of understanding bacterial communities in farms to improve their management. The main objective of this study is to identify pathogenic bacteria by sequencing the 16S ribosomal RNA gene region in shrimp farming areas in the provinces of Guayas and Santa Elena, Ecuador. at the Duloder S.A. Laboratory was carried the isolation out by cultures in selective agar. Subsequently, DNA extraction and purification were performed using the Norgen Biotek kit, ensuring the quality and purity of the extracted DNA. The 16S rRNA gene region was amplified using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with universal primers 8F and 1492 R. PCR products were sequenced using the Sanger method. Bioinformatic analysis of the BLAST sequences identified 18 different bacterial genera, with the most abundant being *Staphylococcus* (21.88%), *Bacillus* (20.83%), and *Vibrio* (19.79%). Pathogenicity-associated genera included *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Shewanella*, known for causing infectious diseases in the sector. Additionally, opportunistic and uncommon bacteria related to possible anthropogenic contamination in nearby pond tributaries, such as *Gulosibacter faecalis*, *Listeria grayi*, and *Morganella sp.*, were detected. Phylogenetic trees were constructed using MEGA X software to analyze the relationship and evolution of the bacteria. The study emphasized the importance of implementing advanced molecular diagnostic techniques to improve the health and management of shrimp farms.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, pathogenic bacteria, 16S rRNA, sequencing, phylogenetic analysis, aquacultur

Capítulo I

1.1. Introducción

Ecuador es líder de la exportación mundial de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Shin et al., 2023; Villarreal, 2023), siendo el sector acuícola una gran fuente generadora de empleo en el país (Gonzabay-Crespin et al., 2021). La producción en Ecuador nació en la década de 1970 en la provincia del Oro, expandiéndose de cultivos extensivos a semi- intensivos, manteniéndose a la vanguardia y tecnificando el sector con alimentadores automáticos, sistemas de aireación y protocolos de manejo (Monsalve & Quiroga, 2022).

La industria camaronera ha atravesado crisis traducidas a pérdidas económicas causadas por enfermedades emergentes producidas por bacterias patógenas, entre las principales enfermedades bacterianas que afectan al camarón blanco se encuentran la Vibriosis, Hepatopancreatitis necrotizante (NHP), Enfermedad de bacteria filamentosa, Infección por rickettsias, Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), Síndrome Zoea II, entre otras (Yu et al., 2022).|

Entre las bacterias asociadas a mortalidades en camarón reportadas mayormente están los reconocidos *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y otros géneros como *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Flavobacterias* (Padilla, 2005). Es importante el conocimiento de las comunidades bacterianas durante el cultivo, ya que su tracto digestivo está compuesto por bacterias patógenas y bacterias benéficas que según las condiciones de estrés a la que el organismo este predispuesto

como cambios de salinidad, pH, temperatura, la alimentación, pueden alterar el estado fisiológico del hospedero, propiciando la proliferación de bacterias oportunistas. (Garibay-Valdez et al., 2020).

La gran cantidad de agentes etiológicos ha llevado a cabo el desarrollo de técnicas diagnósticas para la identificación de bacterias tales como caracterizaciones fenotípicas y bioquímicas entre las más relevantes (Loo et al., 2022), pero la falta de concordancia en características morfológicas o fenotípicas de una cepa de la misma especie puede generar distintos resultados en cuanto a sus características observables (Bou et al., 2011a), lo que vuelve esencial la implementación de técnicas moleculares como procedimientos de identificación complementarios (Bell & Lightner, 1988).

Aunque los métodos tradicionales son rápidos, sencillos y económicos no reflejan la población completa de la diversidad bacteriana, debido a que menos del 1% de bacterias marinas puede ser cultivable (X. H. Zhang et al., 2021) e incluso después de algunas generaciones se pierdan características morfológicas y fisiológicas imposibilitando su identificación (Bartell et al., 2019) por este motivo, la investigación tiene como objetivo aislar distintas cepas bacterianas asociadas a enfermedades infecciosas y pérdidas en la producción, en función a la secuenciación del gen *ARNr 16S*.

Durante décadas se ha utilizado la secuenciación del gen *ARNr 16S* por ser una región altamente conservada y establecer relaciones filogenéticas entre bacterias (Church et al., 2020). Las secuencias son previamente amplificadas por la Reacción en

Cadena de la Polimerasa (PCR), y cuando se establecen las secuencias de una región determinada se comparan con bases de datos del NCBI mediante análisis bioinformáticos (Peker et al., 2019a). La aplicación de estas metodologías permite obtener una mayor especificidad en géneros y especies bacterianas muestreadas en cultivos de camarón (Rodrigues & de Carvalho, 2022).

1.2.Problemática

Desde la aparición del síndrome de Taura, síndrome de la gaviota, síndrome del virus de la mancha blanca hasta agentes etiológicos bacterianos han provocado pérdidas sustanciales en la producción del sector acuícola. La metodología básica o convencional microbiana se fundamenta en respuesta de color para dar tratamientos preventivos. Sin embargo, aunque las técnicas moleculares, como la secuenciación del *ARNr 16S*, surgen como complemento para el mejoramiento del manejo y control de brotes bacterianos, su implementación no ha sido explotada. No obstante, los costos elevados asociados al empleo de metodologías moleculares limitan su accesibilidad. Además, la implementación de estas técnicas requiere una adecuación compleja en laboratorios de producción, incluyendo la adquisición de equipos avanzados y capacitación del personal, representando una inversión considerable, lo que ha contribuido a una baja tasa de adopción hacia las herramientas moleculares en el sector y como resultado, muchos productores continúan aplicando metodologías convencionales.

1.3. Justificación

Las técnicas moleculares surgen como una complementación de las técnicas tradicionales, permitiendo la detección temprana y precisa de enfermedades causadas por una variedad de agentes infecciosos, incluyendo bacterias, virus, hongos y parásitos. En particular, la secuenciación del ARNr 16S ha demostrado ser una herramienta excepcionalmente útil debido a la presencia de secuencias conservadas y relativamente constantes a lo largo de las especies bacterianas, identificando de manera precisa relaciones filogenéticas entre cepas bacterianas, incluso cuando los perfiles fenotípicos pueden variar a través del tiempo. La capacidad de identificar y clasificar bacterias patógenas utilizando el ARNr 16S es crucial en el sector acuícola, donde la rápida y precisa identificación de patógenos puede significar la diferencia entre un brote contenido y pérdidas económicas, aunque las caracterizaciones fenotípicas y bioquímicas siguen siendo importantes, pueden no siempre ofrecer la especificidad y sensibilidad necesarias para el manejo efectivo de brotes bacterianos. La utilización de estos protocolos basados en herramientas moleculares podría ser más eficaces, debido a la detección temprana y precisa de bacterias. Sin embargo, para que estas técnicas sean adoptadas ampliamente, es crucial superar las barreras actuales de accesibilidad y costo. La inversión en la adquisición de equipos avanzados y la capacitación del personal es una medida necesaria y justificada por los beneficios a largo plazo que estas tecnologías pueden ofrecer.

1.4.Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Identificar bacterias patógenas asociadas a zonas productivas en camarón *Litopenaeus vannamei* en las provincias del Guayas y Santa Elena mediante la secuenciación de la región del gen que codifica el ARN ribosomal 16S.

1.4.2. Objetivos específicos

- Extraer el ADN total de bacterias patógenas asociadas al cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*.
- Amplificar la región del gen que codifica el ARN ribosomal 16S mediante PCR a partir del ADN de bacterias patógenas.
- Analizar las secuencias de ADN empleando programas bioinformáticos para identificación y análisis filogenético.

1.5.Hipótesis

Hipótesis alternativa (H1): Hay diferencias significativas en la diversidad filogenética bacterias patógenas asociadas a las enfermedades del camarón *Litopenaeus vannamei*.

Capítulo II

2.1. Marco Teórico

2.1.1. Acuicultura del camarón y su importancia.

Las exportaciones con lo que respecta del 2024 del mes de abril fueron 246.220.925 libras, con respecto a abril del 2023, el sector se recuperó un 4% (CNA, 2024). La producción de camarón lidera los cultivos de crustáceos en el mundo, por poseer una gran importancia comercial y económica (Bardera et al., 2019), alrededor de 9.4 millones de toneladas de camarón fueron producidas en 2022, siendo Ecuador uno de los principales exportadores de la especie *Litopenaeus vannamei*, alcanzando un millón de toneladas en exportaciones en el mismo año. (FAO, 2023).

2.1.2. Enfermedades bacterianas en la acuicultura del camarón.

Las enfermedades bacterianas siempre han estado prevalecientes en el sector acuicultor, probablemente los cambios de temperatura, oxígeno, pH y salinidad, incrementan sus patrones de multiplicación. A pesar de que los camarones cuentan con un exoesqueleto como barrera protectora, las bacterias pueden ingresar a través de

heridas en el exoesqueleto, además de poder ingresar al intestino y hepatopáncreas por medio de la alimentación, el agua y sedimento. (Bondad & Arthur, 2018).

2.1.2.1. Vibriosis

La vibriosis es una enfermedad causada por bacterias de la familia *Vibrionaceae*, siendo responsable de elevadas mortalidades en camarones peneidos, puede provocar retrasos en el crecimiento hasta muertes masivas en diferentes etapas del ciclo de vida del camarón, las larvas pueden verse afectadas con síntomas como necrosis en apéndices, intestino vacío, cromatóforos distendidos. Entre los patógenos causantes de la vibriosis se encuentran las especies *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* como responsable de síndrome de Zoea (Amatul-Samahah et al., 2020; Chandrakala & Priya, 2017; Reyes et al., 2023), las especies de vibrio se encuentran alrededor de todos los cultivos con sistemas y ambientes marinos existentes en el mundo.(Chandrakala & Priya, 2017). Un brote de vibriosis ocurre cuando hay variaciones en los factores ambientales, como los cambios de temperatura, el pH, la salinidad y nutrientes presentes en el medio acuático desencadenando una proliferación rápida de bacterias (de Souza Valente & Wan, 2021).

2.1.2.2. Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP)

NHP es una enfermedad causada por una bacteria intracelular gramnegativa de la especie *Hepatobacter penaei*, que afecta las células epiteliales del hepatopáncreas,

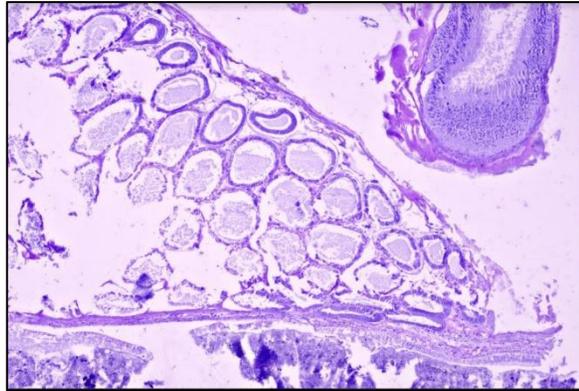
siendo Ecuador afectado con una prevalencia del 70% en los años 2000 al 2015 (Morales et al., 2018), entre los síntomas incluye la anorexia, letargo, exoesqueleto blando, atrofia muscular, atrofia del hepatopáncreas y también lesiones en la cutícula, melanizaciones, oscurecimiento de branquias (Aranguren et al., 2006; Leyva et al., 2018).

2.1.2.3. AHPND

La enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), también llamada síndrome de mortalidad precoz (EMS). El agente etiológico se le atribuye principalmente a especies como *Vibrio owensii*, *Vibrio campbelli* y *Vibrio harveyi*, es expresado por una toxina homóloga a la toxina Pir en los insecticidas (Kumar et al., 2020; Soto et al., 2024). La toxina PirAB se caracteriza por afectar y causar necrosis aguda del hepatopáncreas, provocando el desprendimiento de las células epiteliales en los túbulos (Figura 1), letargo, anorexia y tracto digestivo vacío (Saavedra-Olivos et al., 2018). La mortalidad alcanzada por el AHPND puede llegar al 100% en las granjas camaroneras, afectando varios ciclos desde juveniles y adultos (Soto-Rodríguez et al., 2024).

Figura 1.

Corte histopatológico AHPND



Nota. Descamaciones celulares y disminución en grosor en túbulos (AHPND).

2.2.1. Métodos de diagnóstico de bacterias patógenas en camarones *Penaeidos*.

Es esencial llevar a cabo métodos de detección eficientes y rápidos, poder hacer un seguimiento rutinario para la contención de nuevos brotes en enfermedades bacterianas debido a la importancia de los cultivos de camarón (Kumar & Kumar, 2012). Los métodos de diagnóstico para estos patógenos incluyen técnicas tradicionales que implican características fenotípicas y bioquímicas y métodos moleculares basados en reacción de la cadena polimerasa (Tarh, 2020).

2.2.2. Métodos fenotípicos

Es un método de identificación que consiste en el aislamiento de un cultivo, basado en las características observables a través de modelos estandarizados, utilizando una serie de pruebas bioquímicas, observaciones morfológicas entre ellas características macroscópicas y microscópicas para determinar la identidad de una bacteria, además se requiere de experiencia para la elección de pruebas fiables e interpretación de resultados precisos (Jäckel et al., 2020).

2.2.2.1. Características morfológicas

Se basa en la disposición de las colonias en un medio de cultivo, observando el color, opacidad, forma, textura, entre otras características observables después del período de incubación (Sharma et al., 2023).

2.2.2.2. Pruebas bioquímicas

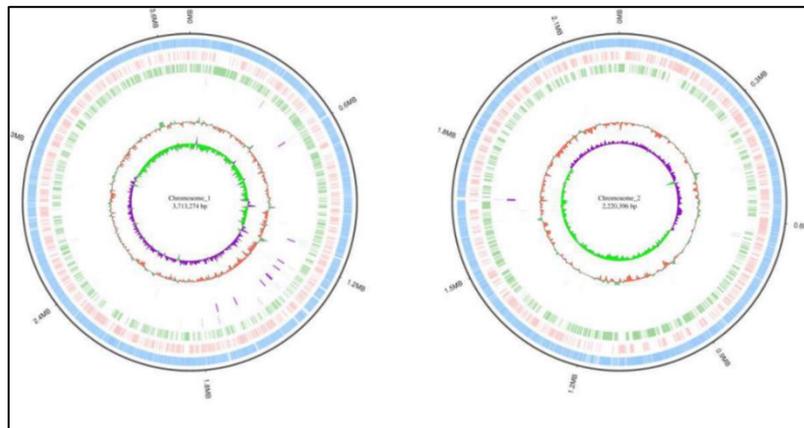
En las identificaciones fenotípicas se utilizan métodos susceptibles a distintas sustancias químicas, los cuales evalúan propiedades metabólicas y enzimáticas propias de las bacterias. Estos sistemas de identificación pueden ser manuales que incluyen pruebas API (bioMérieux), Oxi/Ferm Tube (BD) y los automatizados más utilizados son MicroScan, Vitek, ATB (Bou et al., 2011b; Franco et al., 2019).

2.3. Genoma Bacteriano de los vibrios

El genoma es el conjunto completo de material genético de un organismo, incluyendo todos sus genes y secuencias de ADN no codificantes (Figura 2). Es la “biblioteca” de instrucciones que determina las características de un organismo y cómo funciona (Liu et al., 2023). Cada célula contiene una copia del genoma, que se transmite de generación en generación, siendo el Pan-genoma la inclusión de todos los genes encontrados en todas las cepas de un grupo de especies, la diversidad genética en el genoma permite a las diferentes cepas ocupar distintos nichos ecológicos (Thompson et al., 2009).

Figura 2.

Genoma circular de Vibrio harveyi 345



Nota. Representación del genoma de la cepa *Vibrio harveyi* 345: Cromosoma I (3,713.225 pb) y Cromosoma II (2.220,396 pb). Adaptado de Representación circular del genoma de *V. harveyi* 345 [Ilustración], Deng et al., 2019, <https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-019-6137-8/figures/1>

2.3.1. Métodos moleculares

2.3.1.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN fue accidentalmente descubierta por el médico Friedrich Miescher en 1869. La información genética se almacena en el ADN, siendo el ADN bicatenario presente en casi todos los organismos, incluido las bacterias. La extracción del ADN es la base para realizar cualquier estudio en biología molecular, teniendo múltiples aplicaciones, entre ellas la secuenciación del ADN, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), entre otras (Dairawan & Shetty, 2020).

2.3.1.2. Método de NaCl

El método de NaCl fue expuesto por primera vez en 1988 por Miller, Dykes, and Polesky, consiste en suspender la muestra de ADN en un tampón lisis que contiene NaCl, Tris-HCl pH8,0 y EDTA, los lisados celulares se digieren durante la noche en la incubadora a una temperatura entre 55°-65° con proteinasa K y SDS. Luego se añade NaCl saturado y se centrifuga a 2500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante de ADN es transferido a un nuevo tubo. El ADN se precipita debido a la concentración de sal y mediante la adición de etanol. Por último, la muestra se transfiere a un nuevo tubo con tampón TE para disolver el ADN (Dairawan & Shetty, 2020).

2.3.1.3. Método de CTAB

El CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) es un método basado en detergentes, descrito originalmente por Doyle y Doyle, consiste en preparar un tampón de lisis CTAB al 2 % y los reactivos Tris HCL, EDTA, NaCl; para precipitar el ADN de otros componentes celulares, se utiliza isopropanol o alcohol. El proceso de purificación del ADN por método CTAB consiste en utilizar disolventes orgánicos y alcoholes (Schenk et al., 2023). Es un método que permite utilizar altas concentraciones de NaCl que evita la precipitación del CTAB con polisacáridos, utilizado comúnmente en bacterias y organismos vegetales que producen altas cantidades de polisacáridos, pero presenta limitaciones por utilizar compuestos como el fenol-cloroformo, altamente tóxico (Dairawan & Shetty, 2020).

2.3.1.4. Método de fenol-cloroformo

Es un método que consiste en utilizar un tampón lisis para disolver la membrana celular y liberar el ADN, entre los componentes para lisar las células se pueden utilizar agentes reactivos como Tris, EDTA, NaCl y detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), luego se le agrega a la muestra Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporciones 25:25:1. Formando una emulsión donde el fenol ayuda a desnaturalizar las células, el cloroformo evita que el ADN sea degradado por el fenol y el alcohol separa el ADN de componentes celulares, mediante la centrifugación la emulsión se separa en una fase orgánica y una fase acuosa compuesta por ADN, la fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo, descartando la fase orgánica. El ADN es precipitado

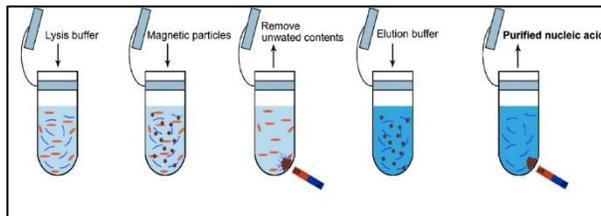
utilizando una solución de acetato de sodio y etanol seguido de una centrifugación para separar el pellet de ADN del resto de la solución, el pellet es lavado con etanol frío para eliminar impurezas o exceso de sales, finalmente se centrifuga el pellet antes de remover el etanol durante tres veces, se descarta el sobrenadante y se deja secar a temperatura ambiente, añadiéndole agua destilada estéril para su re-suspensión y conservación a -20°C (Ghaheri et al., 2016; Panda et al., 2019).

2.3.1.5. Kit de extracción basado en perlas magnéticas

Los kits de extracción de los sistemas de perlas magnéticas tienen modificaciones para mejorar la calidad la adsorción del ADN, las perlas magnéticas están conformadas por magnetita Fe_3O_4 o el $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ maghemita, recubiertas de una sustancia de sílice, cuando la solución tiene un pH bajo y una alta concentración de sal, el ADN cargado negativamente se une a la superficie cargada positivamente de las perlas magnéticas. Las perlas magnéticas se unen al ADN y se separan del lisado celular aplicando un campo magnético, y el sobrenadante es descartado, el ADN es precipitado utilizando etanol e incubando a 65°C para eluir las perlas magnéticas (Figura 3), este método es rápido, ya que no depende del uso de centrifugadoras que por fuerzas de cizallamiento pueden dañar la integridad del ADN (Chen et al., 2020) .

Figura 3.

Sistema de perlas magnética en la extracción de ADN



Nota. Ensayo de extracción de ácido nucleicos en sistema de perlas magnéticas. Adaptado de Sistema magnético de tipo abierto en la purificación de ácidos nucleicos [Ilustración], Chen et al., 2020, <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0165993620301412-gr2.jpg>

2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica fundamental en la biología molecular que permite la amplificación del ADN y requiere de algunos componentes para generar copias de ADN, entre ellos la Taq polimerasa como catalizadora de la síntesis del ADN y resistente a altas temperaturas constituida por el aislamiento de *Thermus aquaticus*, oligonucleótidos que actúa como cebadores para dar inicio a la síntesis de ADN, los dNTPs (trifosfatos de desoxirribonucleósidos) funcionan como bloques de construcción para la formación de nuevas cadenas de ADN y cationes divalentes como el Mg^{2+} necesarios para la actividad de la polimerasa y ayudan a estabilizar la complejidad del cebador-plantilla (Green & Sambrook, 2019).

La PCR involucra ciclos de desnaturalización del ADN que consiste en separar las dos hebras de ADN al elevar la temperatura a $>90\text{ }^{\circ}\text{C}$, rompiendo los enlaces de hidrógeno y obteniendo ADN monocatenario. En segundo lugar, continúa el proceso de hibridación, a una temperatura entre $40\text{ y }70^{\circ}\text{C}$, los cebadores o primers que son

secuencias cortas de ADN complementarias a las regiones que flanquean el ADN objetivo, se añaden y se unen al ADN molde desnaturalizado y, por último, la elongación es realizada por el termociclador a una temperatura de 72°C, la Taq polimerasa se une a los primers y sintetiza la hebra complementaria del ADN utilizando los dNTPs presentes en la mezcla de reacción. Este proceso se repite en ciclos al menos de 20 a 40 veces para amplificar exponencialmente la secuencia de interés (Green & Sambrook, 2019; Kadri, 2020).

2.4.1. Partidores 8F y 1492R

Son cebadores universales 8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y 1492R 5'-TACCTTGTTACGACTT, utilizados comúnmente para amplificar genes de *ARNr 16S* para evaluar poblaciones microbianas en muestras ambientales (R. Y. Zhang et al., 2020).

2.5. Secuenciación de la región conservada del gen *ARNr 16S*

El *ARNr 16S* ha demostrado ser una diana molecular útil ya que está altamente conservado en el tiempo dentro de una especie, es una región que contiene aproximadamente 1500 pares de base de longitud, las cuales incluyen nueve regiones variables (V1-V9), ideales para identificar diferentes taxones bacterianos (Peker et al., 2019b). La secuenciación es una técnica utilizada que permite la identificación de

bacterias mediante el análisis de la región del gen del *ARNr 16S*, que permite establecer relaciones filogenéticas en bacterias (Leunda et al., 2024).

2.5.1. Secuenciación de Sanger

El método de Sanger fue desarrollado por Frederick Sanger en 1977, es tecnología de primera generación, produce secuencias de alrededor de 500 a 1500 pb, este método ha sido considerado durante mucho tiempo el estándar de oro para la secuenciación (De Cario et al., 2020). La secuenciación de Sanger es una técnica basada en la terminación de cadena debido a la incorporación de dideoxinucleótidos ddNTPs durante la síntesis de ADN, los ddNTPs carecen de un grupo OH en el carbono -3, lo cual no permite la elongación de la cadena, cada ddNTPs se encuentra marcado de forma radiactiva o fluorescente para su detección en gel generando fragmentos de distintas longitudes de ADN que son separados por electroforesis capilar y los fragmentos son ordenados para determinar la secuencia de nucleótidos del ADN (Slatko et al., 2018). La secuenciación de Sanger se caracteriza por producir secuencias de ADN de alta calidad con una exactitud del 99,9% (Kozínska et al., 2019).

2.5.2. Secuenciación por síntesis (Illumina)

La secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina se basa en la fragmentación del ADN mediante el uso de transposasas, las cuales cortan el ADN de forma aleatoria en

300 a 500 pares bases, luego se reparan los extremos 3' y 5' y se ligan adaptadores específicos a los fragmentos de ADN (Slatko et al., 2018). Estos adaptadores contienen secuencias que permiten la unión de los fragmentos a una superficie sólida para la amplificación, la celda de flujo. Los fragmentos de ADN se unen a la celda de flujo que contiene oligonucleótidos complementarios a la ligadura del adaptador, el ADN es amplificado, para formar clústers de fragmentos idénticos mediante la técnica de amplificación puente. Durante cada ciclo de amplificación se incorporan nucleótidos fluorescentes con terminadores reversibles, cada vez que un nucleótido se incorpora emite una señal de fluorescencia que se registra y se traduce en una secuencia de ADN (Hu et al., 2021).

2.5.3. Secuenciación de Nanoporos

Es una tecnología de secuenciación de tercera generación, se basa en la lectura directa de moléculas de ADN monocatenario a través de un nanoporo, formado por una proteína llamada alfa-hemolisina (αHL) de estafilococos, la muestra se carga en una celda de flujo que contiene una membrana incrustada con miles de nanoporos. El ADN monocatenario es impulsado a través del nanoporo utilizando enzimas motoras, como la ADN polimerasa, que está unida al adaptador en el extremo 5' del ADN. La ADN polimerasa regula la velocidad de paso del ADN y añade nucleótidos a la cadena en crecimiento. A medida que los nucleótidos individuales pasan a través del nanoporo, se producen cambios en la corriente iónica detectada por sensores, cada nucleótido

produce una señal característica que se registra como un evento de interrupción de corriente. Estas señales se registran en tiempo real y se utilizan para determinar la secuencia del ADN (Hu et al., 2021; Slatko et al., 2018).

2.6. Herramientas bioinformáticas

2.6.1. BLAST

Herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) es un algoritmo y software bioinformático, que busca áreas de similitud entre una secuencia de interés y la compara con secuencias de una base de datos, estas funciones pueden identificar miembros de familias de genes al encontrar secuencias que comparten similitudes significativas, además el desconocimiento de la función de una secuencia nucleotídica o proteica se puede inferir a partir de secuencias similares conocidas (Priyam et al., 2019).

2.6.2. NCBI

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), se fundamenta en el desarrollo de nuevas tecnologías en base a la información que incluye nombres de organismos, calificaciones y datos de secuencias nucleotídicas y proteicas de ADN y ARN (Schoch et al., 2020).

2.6.3. MEGA X

MEGA por sus siglas es Análisis Genético Evolutivo Molecular, es un software que permite analizar la evolución molecular y construir arboles filogenéticos mediante la utilización de algoritmos y análisis estadísticos (Keklik, 2023).

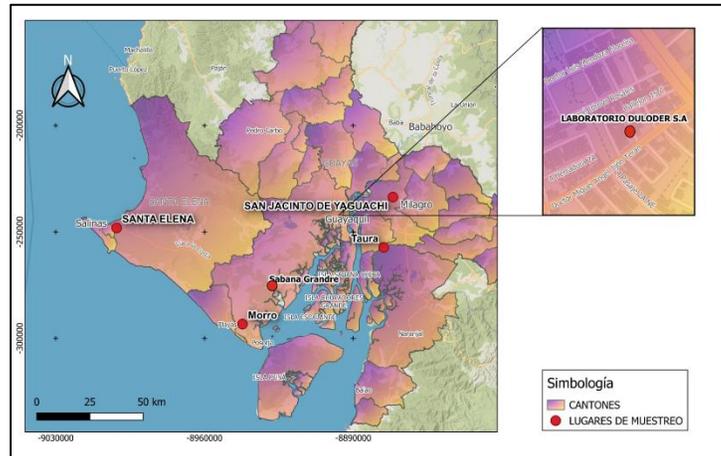
Capítulo III

3.1. Área de estudio

Se tomaron muestras en cinco áreas de producción de camarón en las provincias del Guayas y Santa Elena: Yaguachi (zona A) ($2^{\circ}11'24''\text{S}$ $79^{\circ}53'15''\text{W}$), Santa Elena (zona B) ($2^{\circ}13'0''\text{S}$ y $81^{\circ}0'0''\text{W}$), El Morro (zona C) ($2^{\circ}39'0''\text{S}$ y $80^{\circ}19'0''\text{W}$), Taura (zona D) ($2^{\circ}18'41''\text{S}$ y $79^{\circ}43'59''\text{W}$) y Sabana Grande (zona E) ($2^{\circ}28'42.39''\text{S}$ y $80^{\circ}13'47''\text{W}$) (Figura 4).

Figura 4.

Ubicación geográfica.



Nota. Zonas de recolección de muestras en sistemas de producción de camarón de las provincias Guayas y Santa Elena y área de procesamiento en laboratorio Duloder S.A.

3.2. Muestreo

Se recolectó 1 gramo en larvas y 10 organismos juveniles que presentaron signos clínicos específicos como nado errático, reducción del crecimiento, melanizaciones en cutícula, intestino vacío, urópodos rojos entre otros (Lightner & Redman, 1998), se tomaron dos muestras por semana en dos piscinas de las zonas establecidas en el estudio, las muestras se transportaron en doble funda plástica con

oxígeno disuelto, para luego ser procesadas en el laboratorio Duloder S.A., situado en la ciudad de Guayaquil, Ecuador, coordenadas 2°08'41''S 79°53'12''W.

3.2.1. Siembra y aislamiento

Las muestras recolectadas fueron lavadas con agua destilada estéril y se realizó la extracción del hepatopáncreas de 10 organismos. Se tomaron tubos Eppendorf colocando la muestra del hepatopáncreas hasta llegar al volumen de 1 gramo, en la cámara de flujo laminar se realizó la siembra en disoluciones seriadas de 1:10, 1:100 y 1:1000. Las muestras recolectadas fueron sembradas por el método de vertido en agar TSA, TCBS, CETRIMIDE Y CHROMOAGAR. Las placas fueron cultivadas a 32 °C por 24 horas, el conteo de colonias se realizó posterior a las 24 horas tomando en cuenta las colonias que se encontraban distantes para evitar contaminación, se seleccionó las colonias más representativas de cada placa y se realizaron purificaciones en agar TSA con el rayado de estrías, los recuentos bacterianos fueron cuantificados en UFC/g (Muthukrishnan et al., 2019).

3.2.2. Criopreservación de bacterias

Se preparó agar TSB por ser un medio de cultivo que permite el crecimiento de bacterias exigentes, utilizando un agente crioprotector como el glicerol. Su preparación consistió en disolver 30 g de agar TSB en un litro de agua destilada, agregando 2% de

NaCl y 10% glicerol, esta preparación fue esterilizada en la autoclave. Se dejó enfriar y se colocó 1000 μ L del criopreservante en la caja Petri donde se encontraban las bacterias aisladas en agar TSA, y con un macerador se resuspendieron las bacterias, extrayendo el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 ml, posteriormente se etiquetaron los tubos según el código de la bacteria y se congelaron a -20°C (Tedeschi & De Paoli, 2011; R. Yang et al., 2020).

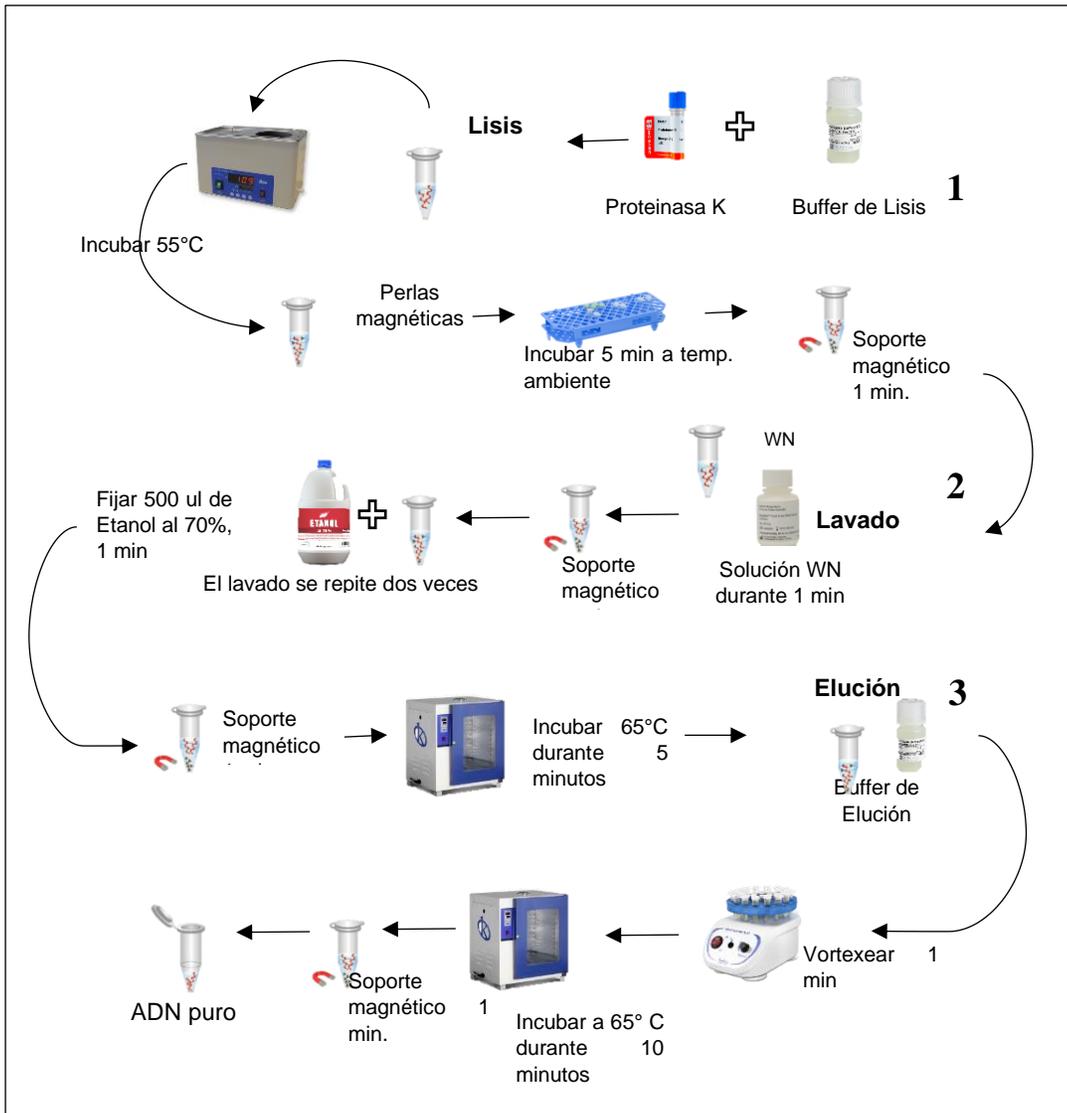
3.3. Extracción y purificación del ADN

Se tomaron tubos eppendorf de 1,5 ml y se añadió 100 μ L de PBS, la bacteria previamente aislada en agar TSA fue añadida al tubo de muestra, se adicionó 20 μ L de proteínasa K y luego se agregó 300 μ L del Buffer de Lisis y se incubó a 55°C en baño maría por 20 minutos. Al tubo de la muestra se le agregó 400 μ L de etanol al 100% y 40 μ L de perlas magnéticas (previamente se vortexeó antes de usar), luego se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, ocasionalmente se invertía el tubo. El tubo de muestra se colocó en el soporte magnético, dejando que se asiente por 1 minuto, se realizó la aspiración y descarte del sobrenadante sin tocar las perlas. Luego la muestra fue removida del soporte magnético y se adicionó 500 μ L de solución WN, haciendo resuspensiones por pipeteo e incubando a temperatura ambiente durante 1 minuto. El tubo de muestra se colocó nuevamente en el soporte magnético permitiendo que las perlas magnéticas se fijen durante 1 minuto, después se aspiró y descarto el sobrenadante sin tocar las perlas. El tubo fue removido del soporte magnético y se

añadió 500 μL etanol al 70%, recién preparado. La muestra fue resuspendida por pipeteo e incubada a temperatura ambiente durante 1 minuto, luego se colocó la muestra en el soporte magnético durante 1 minuto, se aspiró y descartó el sobrenadante sin tocar las perlas, este proceso de lavado se repitió dos veces. La muestra se incubó a 65°C durante 5 minutos con la tapa abierta en el soporte magnético para secar perlas. Seguidamente se removió la muestra del soporte y se añadió 100 μL del Buffer de Elución, posteriormente vortaxeando la muestra. Luego se incubó a 65°C por 10 minutos y finalmente se colocó el tubo de muestra en el soporte magnético durante 1 minuto y se transfirió la elución a un tubo eppendorf de 1,7 ml nuevo y esterilizado sin tocar las perlas y se almacenó a -20°C (Fig 5.) (NORGEN BIOTEK, 2022).

Figura 5.

Protocolo de extracción de ADN.



Nota. Proceso gráfico del protocolo de extracción de ADN.

3.4. Cuantificación del ADN

Se rectificó la pureza del ADN mediante el proceso de cuantificación por espectrofotometría. El NanoDrop cuantificó las muestras determinando el valor promedio de concentración de ADN en cada una, el NanoDrop trabaja con longitudes de onda en una relación de 260 nm a 280 nm. La calidad del ADN se calculó según el nivel de absorbancia de onda. La proporción 260/280 se debe encontrar entre un rango de 1.8 – 2.0, lo que indica si el ADN es puro y libre de contaminación por presencia de proteínas (Hikmawati et al., 2019), y la relación 260/230 determina la contaminación por compuestos orgánicos y deber ser > 1.8 (Melo-Bolívar et al., 2022).

3.5. Amplificación del ADN bacteriano

Una porción del gen del ARN 16S del ADN genómico extraído de cada aislado bacteriano se amplificó con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el conjunto de cebadores universales 8F como cebador directo: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y 1492R como cebadores inversos: GGTTACCTTGTTACGACT. La reacción de PCR consistió en una mezcla de 10 µL de GoTaq Green Master Mix en una concentración de 1 µmol, 0,5 µL de cebadores con una concentración de 10 µmol (8 Forward y 1492 Reverse), 7 µL de H₂O ultrapura y 2 µL de ADN para alcanzar un volumen total de 20 µL (Tabla 1). (Govindan, 2019) (Zupićić et al., 2024). La PCR se sometió a desnaturalización inicial a 95°C durante 3

min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1,30 minutos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos (Kang et al., 2022).

Tabla 1.

Mezcla utilizada en la PCR para la amplificación del gen ARNr 16S.

Componentes	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración Final
GoTaq® Green	2X	10	1x
Master Mix			
8 F	10mM	0.5	0,5 mM
1492 R	10mM	0.5	0,5 mM
ADN	100 ng aprox	2	-
H2O	-	7	-
Total	-	20	-

Nota. Condiciones y componentes establecidos para la amplificación del gen ARNr 16S.

3.6. Electroforesis

El producto de la amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% en una solución TAE 1X y 3,5 µL de colorante de bromuro de etidio en el tanque de electroforesis durante 30 minutos con voltaje de 120 V y la observación del gel de electroforesis se llevó a cabo utilizando un transiluminador UV (H. Yang et al., 2022).

3.7. Secuenciación del *ARNr 16S*

El producto de PCR fue preparado para la secuenciación siguiendo los requisitos específicos: la cantidad de ADN genómico (ADNg) debía ser de 30-50 ng, con un volumen mínimo de 20 µl. Posteriormente, el producto de PCR fue purificado y secuenciado en Macrogen Company, Seúl, Corea (dna.macrogen.com) por el método de Sanger. (Yen et al., 2021).

3.8. Análisis estadístico

Los resultados de la secuenciación fueron analizados en la base de datos del NCBI mediante la herramienta de búsqueda de alineación local básica BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para su identificación (Orondo et al., 2023). El árbol filogenético se construyó con el software MEGA X utilizando el algoritmo de

Maximum Likelihood y el modelo evolutivo 2-parámetros de Kimura (Franco et al., 2020).

Capítulo IV

4.1 Resultados

4.1.2. Extracción del ADN bacteriano

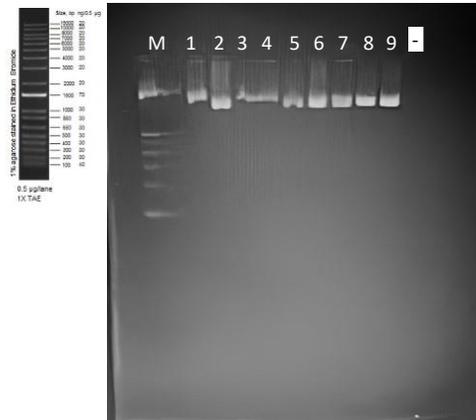
Se realizó la cuantificación de las muestras de ADN, las concentraciones demostraron un rango variable desde 408,3 ng/ μL a 0,4 ng/ μL . La relación 260/280 que permite medir las soluciones proteicas presento un rango 0,39 nm hasta 2,62 nm. Por último, la relación 260/230 evalúa la pureza del ADN por contaminantes orgánico o fenólicos, esta relación osciló entre 0,11 nm hasta 2,42 nm.

4.1.3. Amplificación por PCR del gen *ARNr 16S*.

Se llevó a cabo la electroforesis, el tamaño de bandas de los 96 aislados varió entre 1000 a 1400 pb, según la Figura 6,7, el producto de PCR fue amplificado de las muestras en los carriles 1-20, se observa que todos los carriles tuvieron una buena migración ubicándose entre 1300 a 1400 pb según el marcador molecular, los controles fueron negativos, lo que demuestra que no hubo productos de contaminación por ADN que afecten las muestras.

Figura 6.

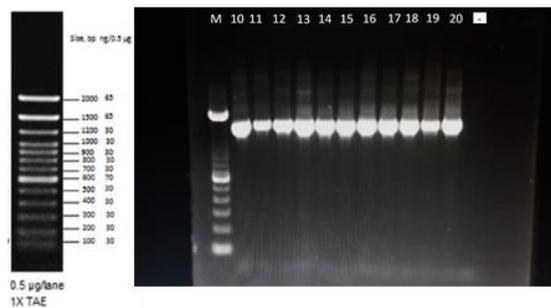
Migraciones del producto PCR, muestras 1-9.



Nota. Electroforesis del gen *ARNr 16S* purificado. Carriles: M; marcador de peso molecular de 1500pb; 1-10 y Control Negativo

Figura 7.

Migraciones del producto PCR, muestras 10-20.

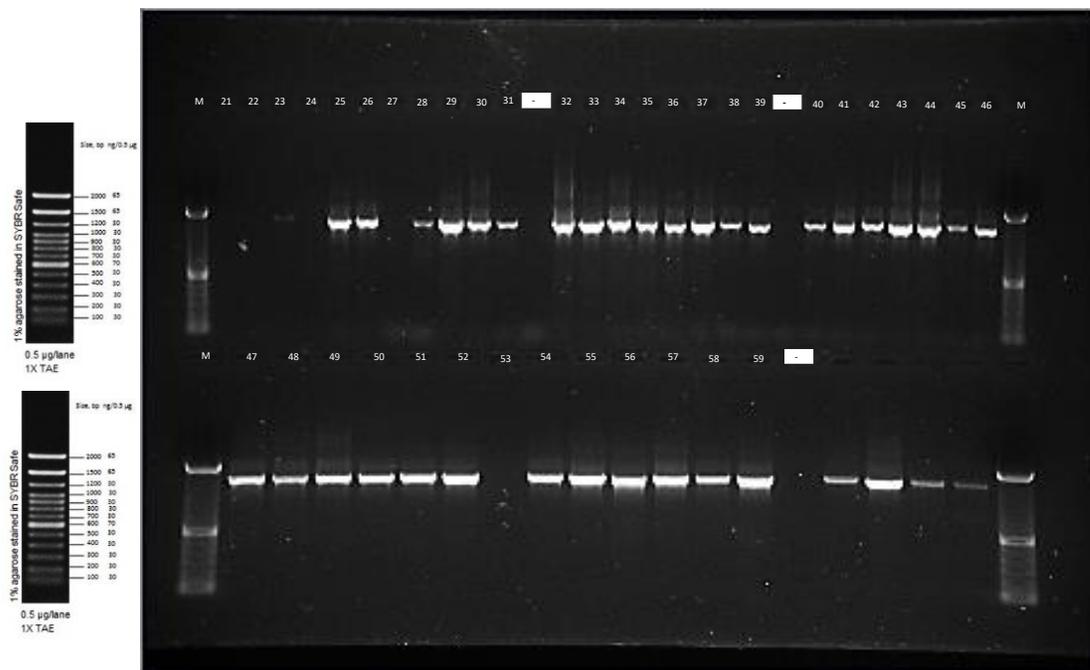


Nota. Electroforesis del gen *ARNr 16S* purificado. Carriles: M; marcador de peso molecular de 1500pb; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20 y Control Negativo

Las migraciones en muestras de 21-59 fueron satisfactorias, exceptuando en los carriles 21, 22, 24 y 53 las cuales fueron repetidas hasta la obtención de resultados positivos, adicionalmente, los controles negativos no presentaron bandas, indicando la ausencia de contaminación o amplificación inespecífica (Figura 8).

Figura 8.

Migraciones del producto PCR, muestras 21-59

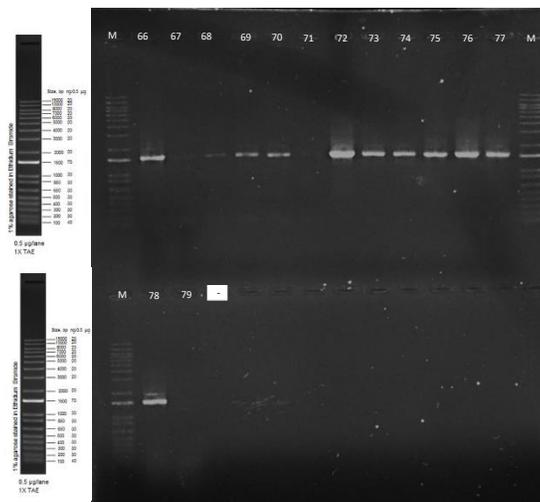


Nota. Electroforesis del gen *ARNr 16S* purificado. Carriles: M; marcador de peso molecular de 1500 pb; 21-31 y Control (-); 32-39 y Control (-); 40-59 y Control (-).

En las muestras amplificadas del producto PCR tuvimos una buena migración de la banda observadas mediante la fotografía de la (Figura9), a excepción de las muestras 67, 71, 79, donde no surgió una amplificación aparente, lo que implicó la repetición de esas muestras obteniendo resultados positivos. Se observa el tamaño de las bandas, siendo alrededor de 1400 pb y el pocillo de control fue negativo, lo que nos demuestra que no hay ADN contaminante.

Figura 9.

Migraciones del producto PCR, muestras 66-79.



Nota. Electroforesis del gen *ARNr 16S* purificado. Carriles: M; marcador de peso molecular de 1500 pb; 66-79y Control (-).

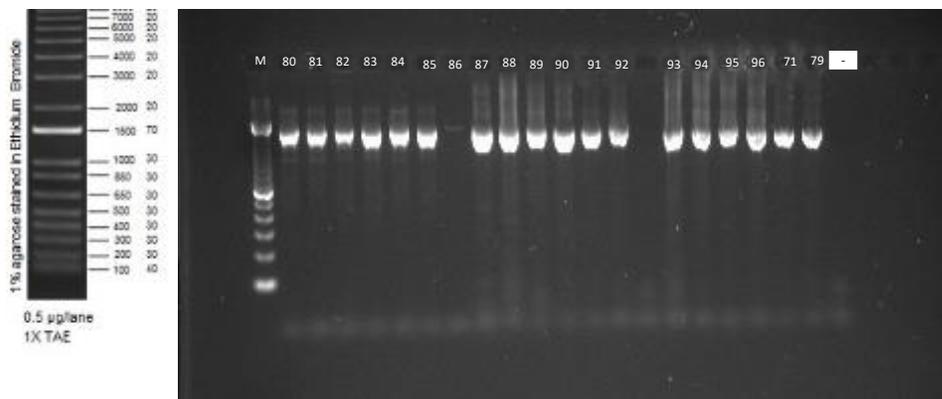
Al analizar los productos amplificados mediante PCR de las muestras 80 a 96, se observó un patrón de migración satisfactorio en la electroforesis, tal como se muestra

en la (Figura10). Este grupo presentó una amplificación notable en todos los casos, lo que indica que el proceso de replicación del ADN fue exitoso. El tamaño aproximado de las bandas visualizadas fue de alrededor de 1400 pares de bases, que era lo que se esperaba. Adicionalmente, el pocillo de control no mostró presencia de material genético contaminante, descartando así cualquier interferencia externa en los análisis.

Las muestras 71 y 79 fueron procesada nuevamente en este grupo, finalmente, todos los pocillos exhibieron una migración adecuada desde el primer intento.

Figura 10.

Migraciones del producto PCR, muestras 80-96 y repeticiones de 71 y 79.



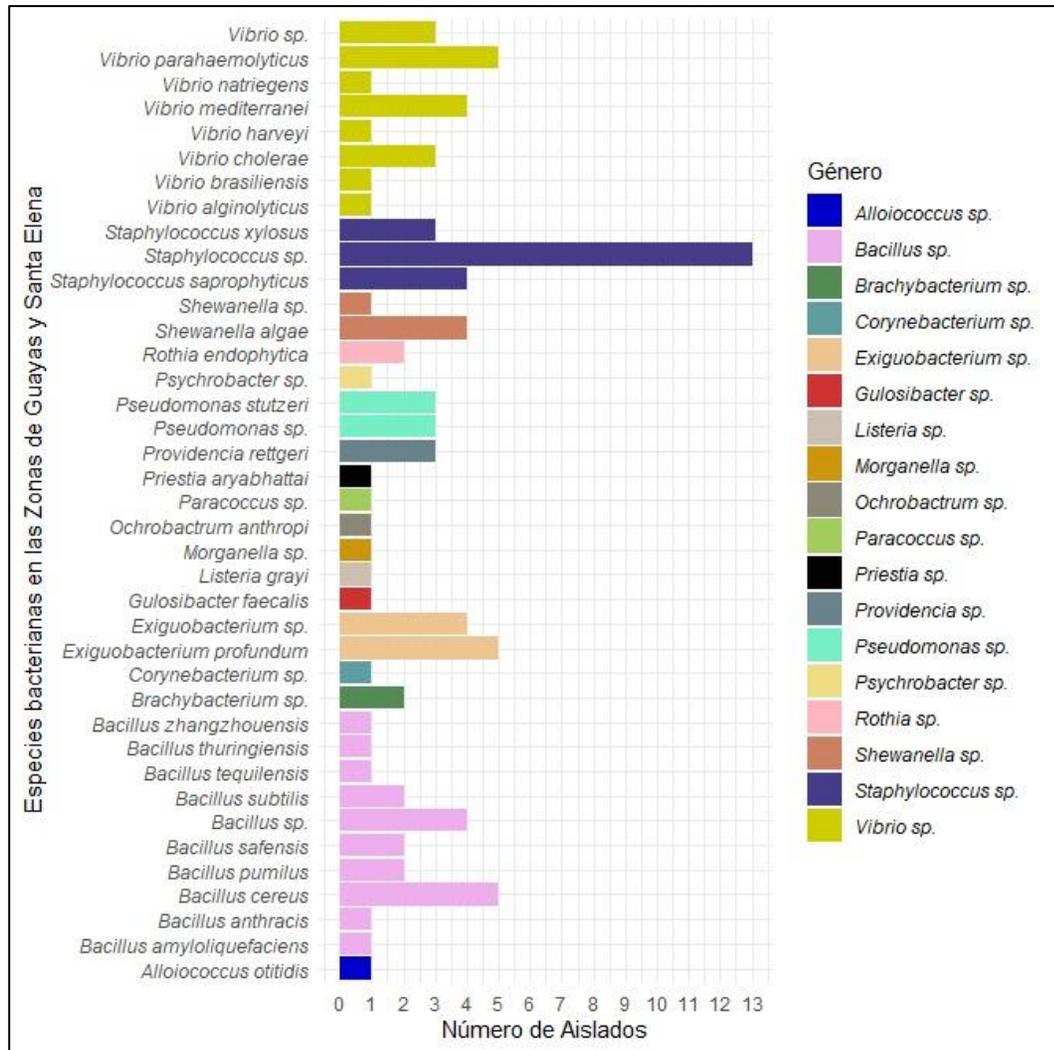
Nota. Electroforesis del gen *ARNr 16S* purificado. Carriles: M; marcador de peso molecular de 1500 pb; 80-96, repeticiones de 71 y 79 y Control (-).

4.1.4. Identificación de aislados bacterianos

La identificación bacteriana se realizó mediante la herramienta BLAST, las secuencias de *ARNr 16S* derivadas de los 96 aislados fueron depositadas en la base de datos y se evidenció que en las zonas muestreadas de Guayas y Santa Elena hay 18 géneros de bacterias (Figura 11). Los géneros que representaron una mayor abundancia fueron *Staphylococcus sp.* con 21,88%, *Bacillus sp.* 20,83% *Vibrio sp.* 19,79%, seguido de los géneros en menor abundancia *Exiguobacterium sp.* 9,38%, *Pseudomonas sp.* 6,25%, *Shewanella sp.* 5,21%, *Providencia sp.* 3,13%, *Brachybacterium sp.* 2,08%, *Rothia sp.* 2,08%, y los géneros que presentaron al menos un individuo por aislado *Paracoccus sp.* , *Listeria sp.*, *Priestia sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Psychrobacter sp.*, *Gulosibacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Morganella sp.*, representando 1,04% cada uno de ellos.

Figura 11.

Número de bacterias identificadas en las zonas productivas de Guayas y Santa Elena

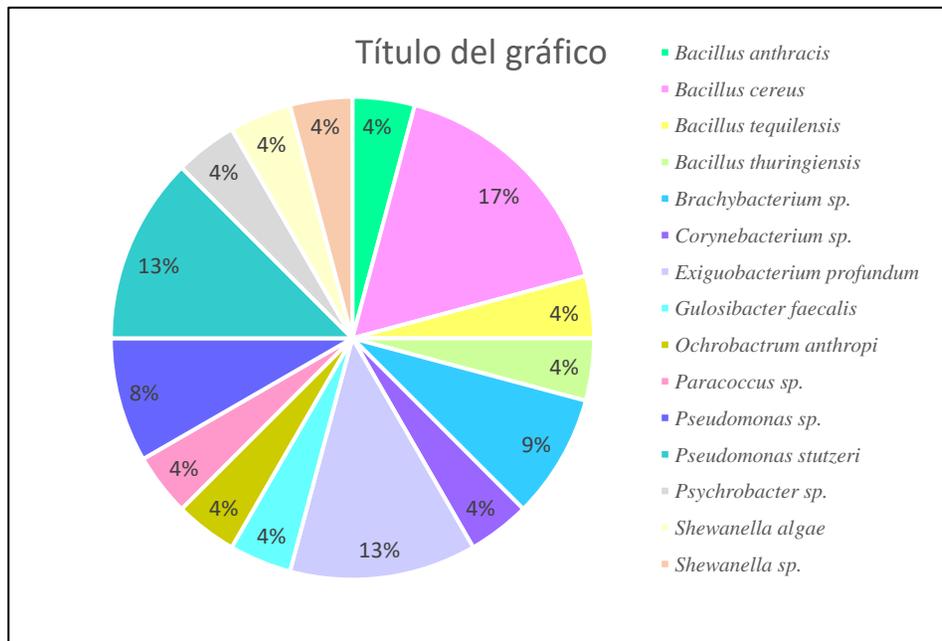


Nota. Géneros y Especies bacterianas identificadas por la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica BLAST.

Los aislados fueron identificados por cada zona específica muestreada, en la zona de Yaguachi se detectaron las especies del género *Bacillus*, entre ellas *Bacillus cereus*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, con una abundancia de 16,67% y 4,17% en los tres últimos respectivamente. Para la especie *Pseudomonas stutzeri*, *Exiguobacterium profundum* se halló una abundancia de 12,50% y de 8,33% para los géneros *Brachybacterium sp* y *Pseudomonas sp.* y los géneros y especies *Corynebacterium sp*, *Paracoccus sp*, *Psychrobacter sp*, *Gulosibacter faecalis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Alloiococcus otitidis* se hallaron en proporción de 4,17% cada una de ellas (Figura 12).

Figura 12.

Identificación bacteriana en la zona de Yaguachi.

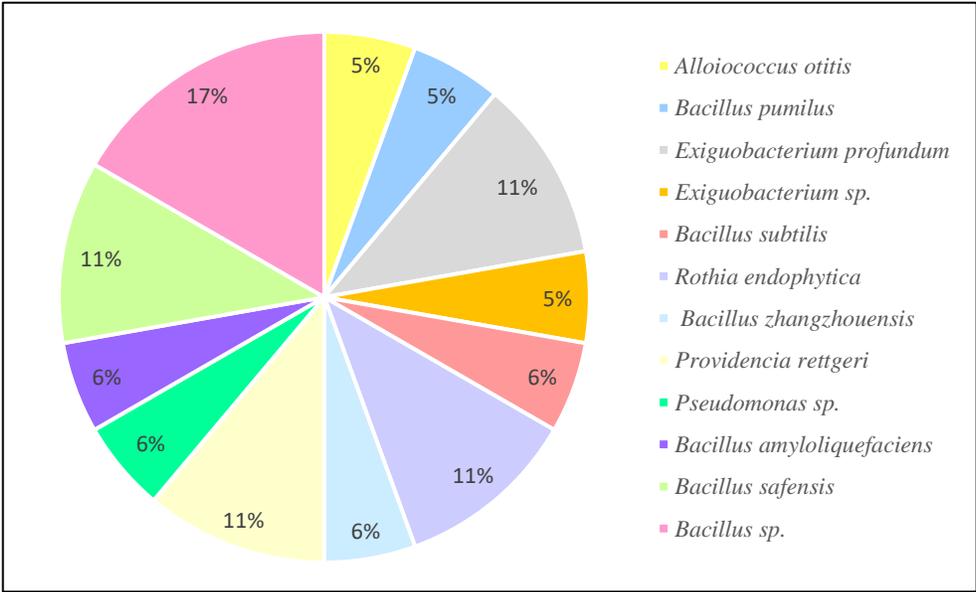


Nota. Abundancia en la identificación bacteriana de la zona de Yaguachi.

En la zona de Santa Elena el género *Bacillus sp.* tuvo una abundancia de 16,67%, seguido de las especies bacterianas *Bacillus safensis*, *Exiguobacterium profundum*, *Rothia endophytica* se encontraron a una razón de 11,11% y 5,56% en las especies *Alloiococcus otitis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus zhangzhouensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y los géneros *Exiguobacterium sp.* y *Pseudomonas sp.* (Figura 13).

Figura 13.

Identificación bacteriana en la zona de Santa Elena.

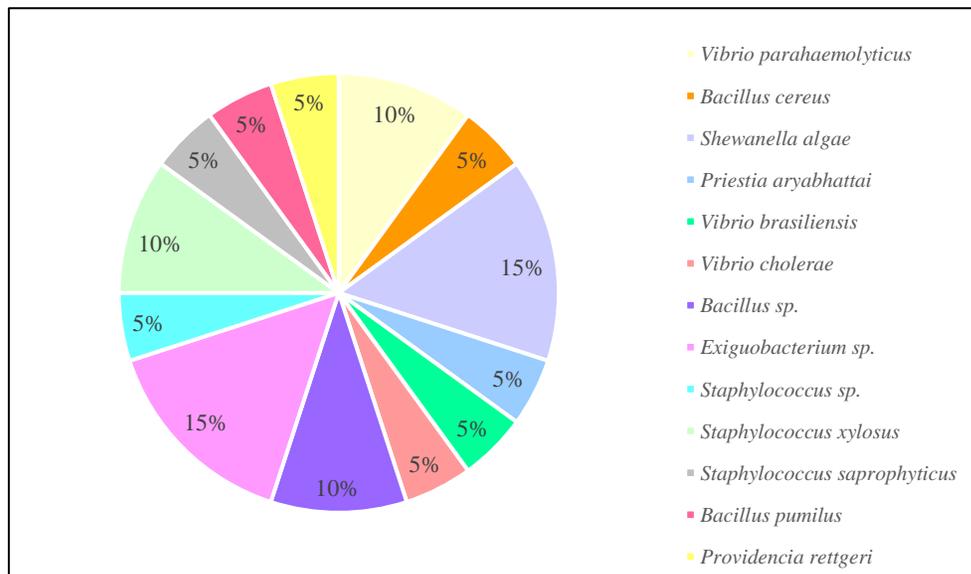


Nota. Abundancia en la identificación bacteriana de la zona de Santa Elena.

Entre las bacterias más abundantes en la zona de Taura con el 15% se encuentra *Shewanella algae* y *Exiguobacterium sp*, y a una razón de 11,11% se hallaron los *Bacillus sp.* y *Staphylococcus xylosus* y las especies *Bacillus cereus*, *Priestia aryabhatai*, *Vibrio brasiliensis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus pumilus*, *Providencia rettgeri* y el género *Staphylococcus sp.* representaron el 5% de abundancia (Figura 14).

Figura 14.

Identificación bacteriana en la zona de Taura.

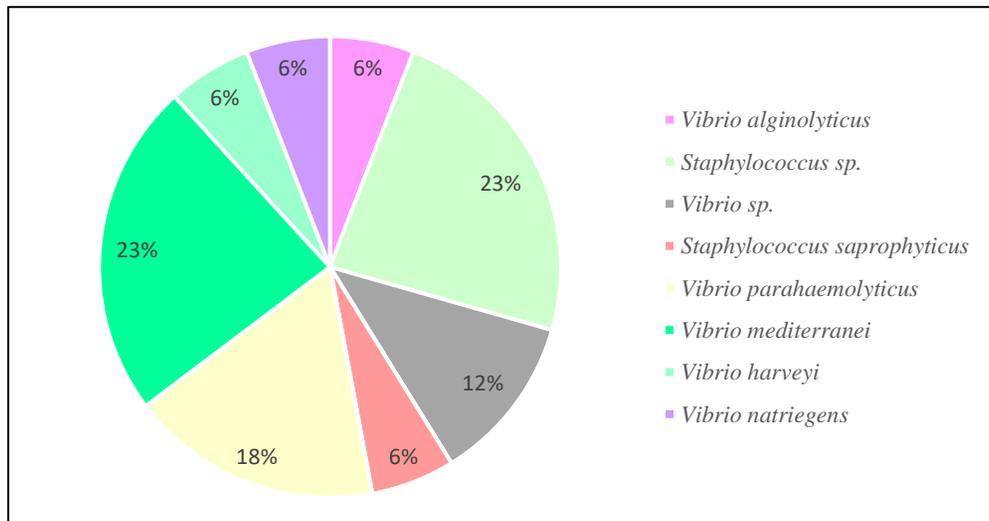


Nota. Abundancia en la identificación bacteriana de la zona de Taura.

En el Morro se halló una mayor abundancia de bacterias asociadas a enfermedades de cultivos entre ellos el *Vibrio mediterranei* y *Staphylococcus sp.* con un porcentaje de 23,53%, la especie bacteriana de *Vibrio parahaemolyticus* representó una abundancia de 17,65% y el género *Vibrio sp.* se determinó a un porcentual de 11,76%, por último, la especies *Staphylococcus saprophyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio natriengens* se encontraron en menor abundancia con un valor de 5,88% (Figura 15).

Figura 15.

Identificación bacteriana en la zona del Morro.

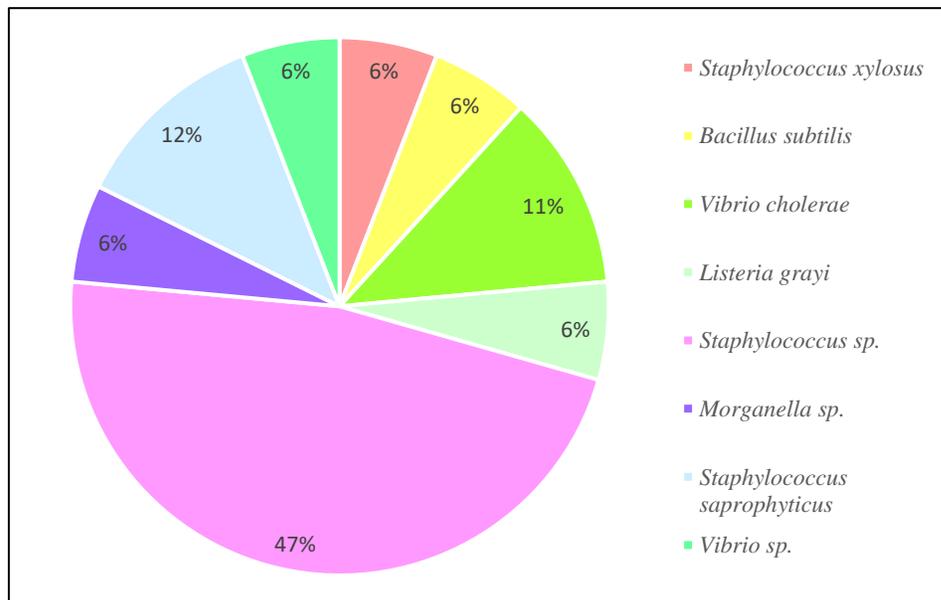


Nota. Abundancia en la identificación bacteriana de la zona del Morro.

En la zona de Sabana Grande, el género *Staphylococcus sp.* se encuentra en mayor abundancia de 47,06%, y las especies *Staphylococcus saprophyticus* y *Vibrio cholerae* representan el 11,76%, mientras que las especies de menor abundancia son *Morganella sp.*, *Vibrio sp.*, *Staphylococcus xylosum*, *Bacillus subtilis*, *Listeria grayi* con un porcentaje de 5,88% cada una de ellas (Figura 16).

Figura 16.

Identificación bacteriana en la zona de Sabana Grande.



Nota. Abundancia en la identificación bacteriana de la zona de Sabana Grande.

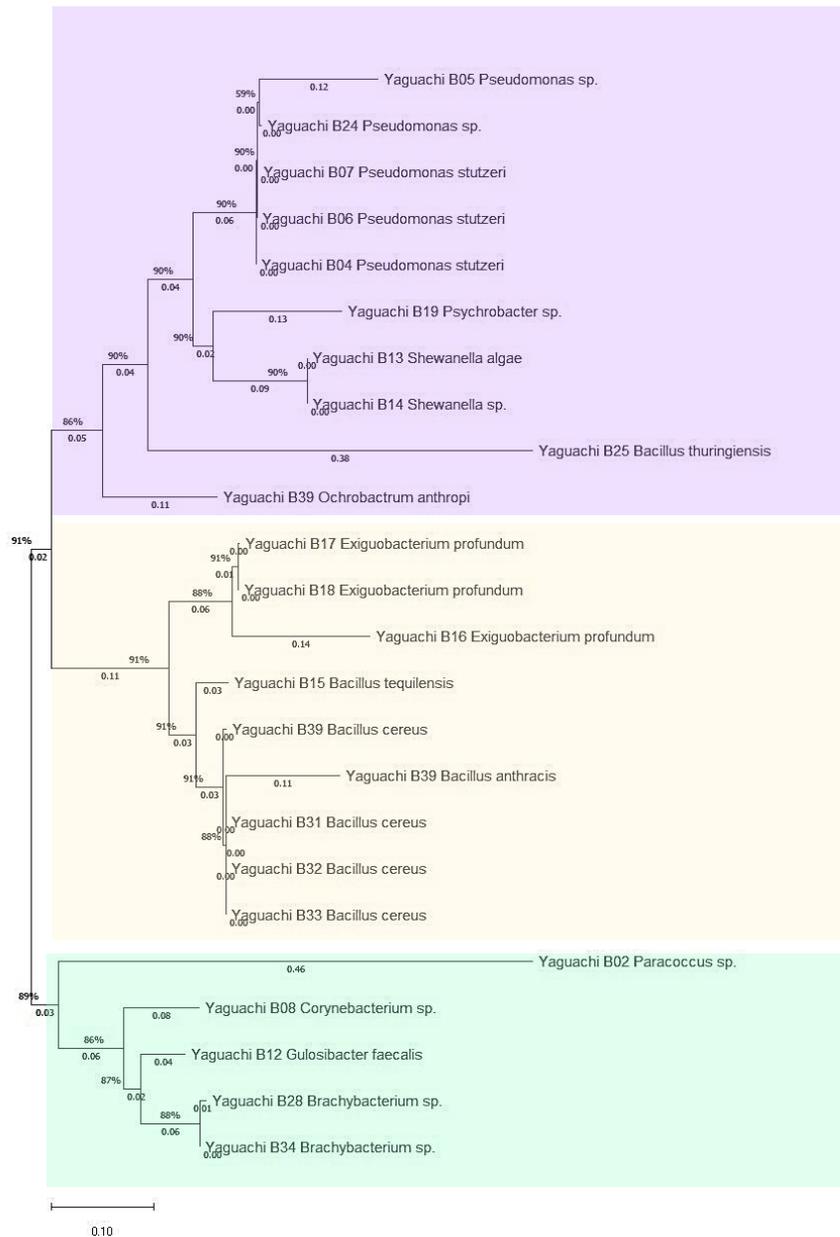
4.1.5. Análisis filogenético

Se construyeron seis árboles filogenéticos por cada zona de muestreo constituyendo Yaguachi, Taura, El Morro, Sabana Grande y Santa Elena, y el último árbol se construyó en base a todas las secuencias bacterianas identificadas.

En la Figura 17 representa el árbol filogenético en el área de Yaguachi se dividió en tres clados, se observa que *Bacillus thuringiensis* se encuentra en el primer clado acercándose evolutivamente al phylum Pseudomonadota, donde se muestran bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Psychrobacter* y *Shewanella* con 90% de confianza. *Ochrobactrum anthropi* al igual se encontró en el primer clado con un 85% de confianza y su longitud de rama es 0,11 según la escala, alejándose 0,07 de sus otros parientes lejanos. En el clado dos se ubicaron los géneros *Exiguobacterium* y *Bacillus* del phylum Bacillota, divergiendo filogenéticamente la longitud de sus ramas 0,06 y 0,03 con un 91% de confianza. Por último, en el clado tres se encuentran los géneros *Corynebacterium sp.*, *Gulosibacter sp.*, *Brachybacterium sp.*, pertenecientes al phylum Actinomycetota agrupados en un subclado con 86% de confiabilidad distanciándose de *Paracoccus sp.* la cual presenta una longitud en rama de 0,46 números de nucleótidos sustituidos por cada 100.

Figura 17.

Árbol filogenético de bacterias en la zona de Yaguachi.



Nota. Historia evolutiva de secuencias bacterianas de la zona de Yaguachi, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de 2 parámetros de Kimura con un Bootstrap de 500 réplicas.

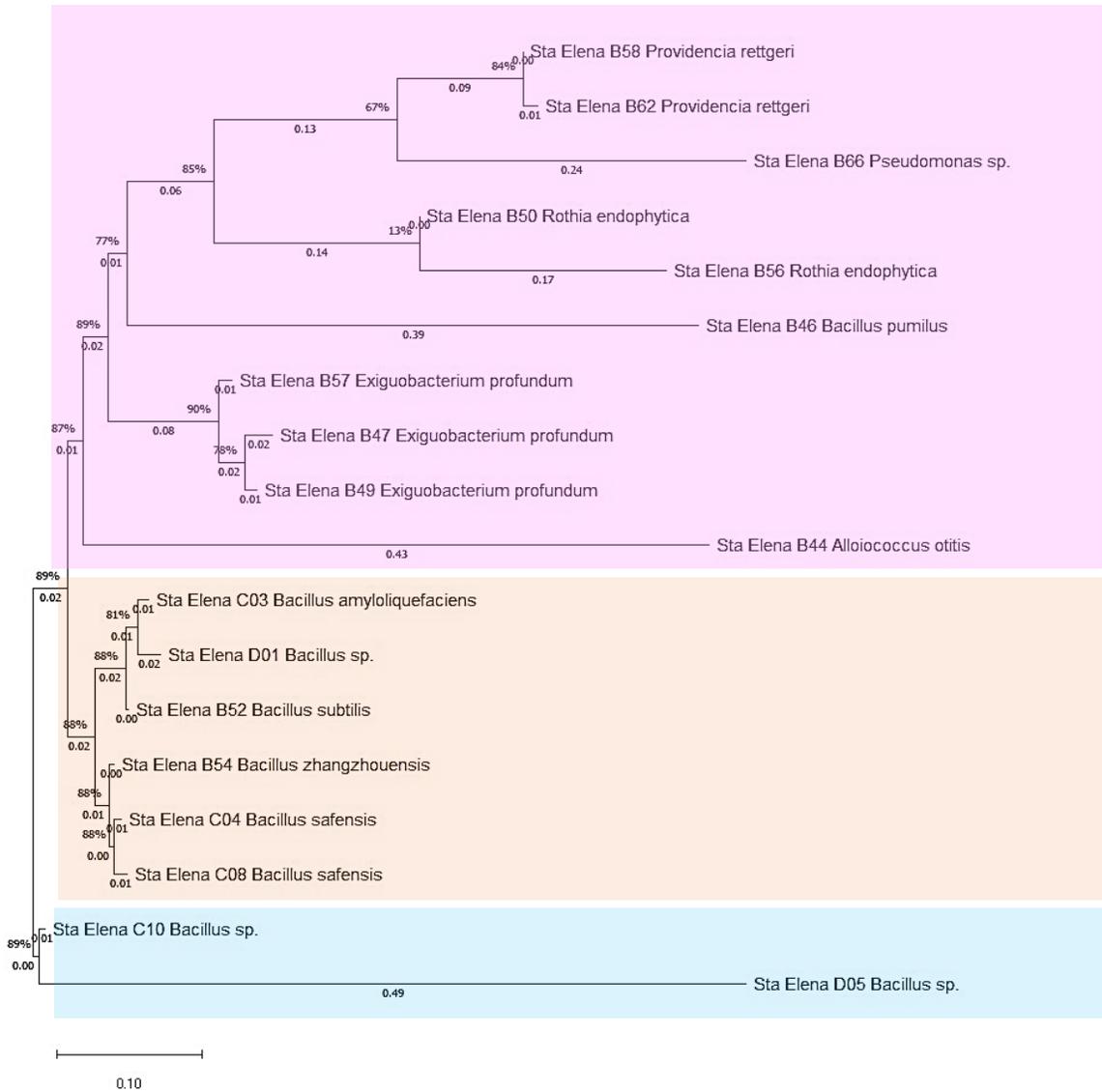
En el segundo árbol filogenético (Figura 18), se dividió en tres clados, las bacterias *Providencia rettgeri* y *Pseudomonas sp.*, se encontraron dentro del phylum Pseudomonadota, su longitud de rama filogenética es de 0,13 y diverge de la agrupación de las especies *Rothia endophytica* del phylum Actinomycetota con una longitud de rama de 0,14, este subclado conformado dos filos tiene un 85% de confianza. La especie bacteriana *Alloicoccus otitis* se halló externamente de los subclado conformado por *Exiguobacterium sp.* pero aun así están estrechamente relacionados, por pertenecer al mismo phylum. Los *Bacillus* se distribuyeron en los tres clados, *Bacillus pumilis* en el primer clado, tiene una longitud de rama de 0,39 y se encuentra relacionado cercanamente con bacterias de phylum Pseudomonadota, a pesar de pertenecer al phylum Bacillota.

El clado dos se formó con un nivel de confianza de 88%, esta asociado a la mayoría de especies de *Bacillus*, la cepa D01 no fue identificada a nivel especie, pero está estrechamente relacionada a *Bacillus amyloliquefaciens* con una distancia nucleotídica de la longitud de rama de 0,01.

Al final se formó un tercer clado con una confiabilidad de 89% y está separado del segundo clado por una distancia de 0,02, en este clado hay dos individuos del mismo género, para la cepa C10 con una distancia de rama de 0,01 y D05 con una distancia de 0,49.

Figura 18.

Árbol filogenético de bacterias en la zona de Santa Elena.



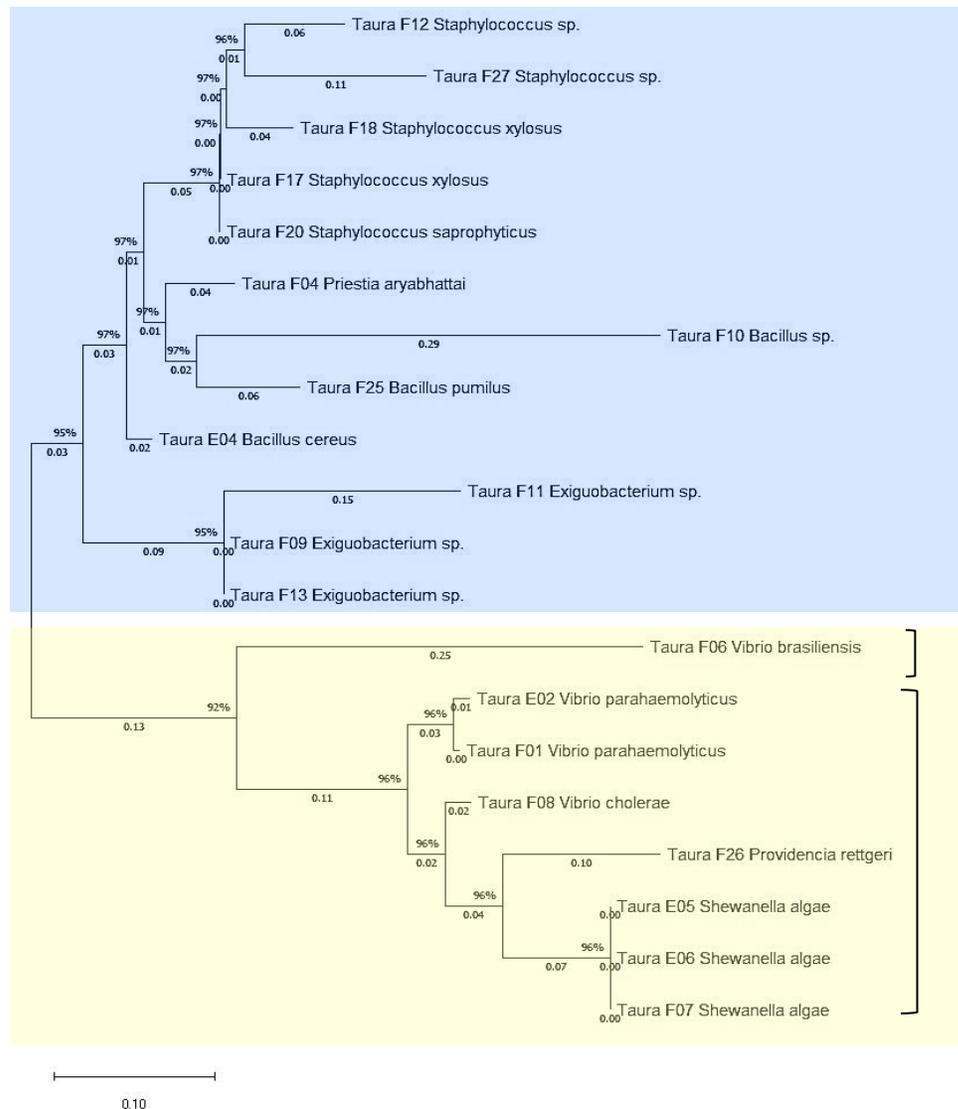
Nota. Historia evolutiva de secuencias bacterianas de la zona de Santa Elena, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de 2 parámetros de Kimura con un Bootstrap de 500 réplicas.

El tercer árbol filogenético se construyó en base a las secuencias registradas en Taura. Como se observa en la (Figura 19), se dividió en dos clados, el primer clado se formó con el 95% de confianza y tiene una longitud de rama de 0,03, lo conforma el phylum Bacillota, encontrándose géneros propiamente de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Exiguobacterium* y *Priestia*. La especie *Bacillus cereus* antecede a los subclados conformados por *Staphylococcus*, *Priestia* e incluso a *Bacillus pumilis* y la cepa F10 *Bacillus sp.*, estas dos últimas tienen una distancia en cada una de sus ramas de 0,06 y 0,29 respectivamente.

En el segundo clado con un nivel de significancia del 92%, con una distancia en su rama de 0,13 se agruparon bacterias pertenecientes al phylum Pseudomonadota o Proteobacteria, *Vibrio brasiliensis* se encontró en el primer subclado separándose del segundo subclado por dos ancestros, las cepas de *Vibrios parahaemolyticus* se estuvieron emparejadas y divergen por 0,01 nucleótidos. El segundo subclado con un 96% de confianza donde está ubicado la cepa *Providenci rettgeri* al pertenecer al mismo filo se encuentra evolutivamente asociado a *Shewanella algae*, pero divergen por dos ancestros y por 0,03 nucleótidos según la escala en la longitud de sus ramas.

Figura 19.

Árbol filogenético de bacterias en la zona de Taura.



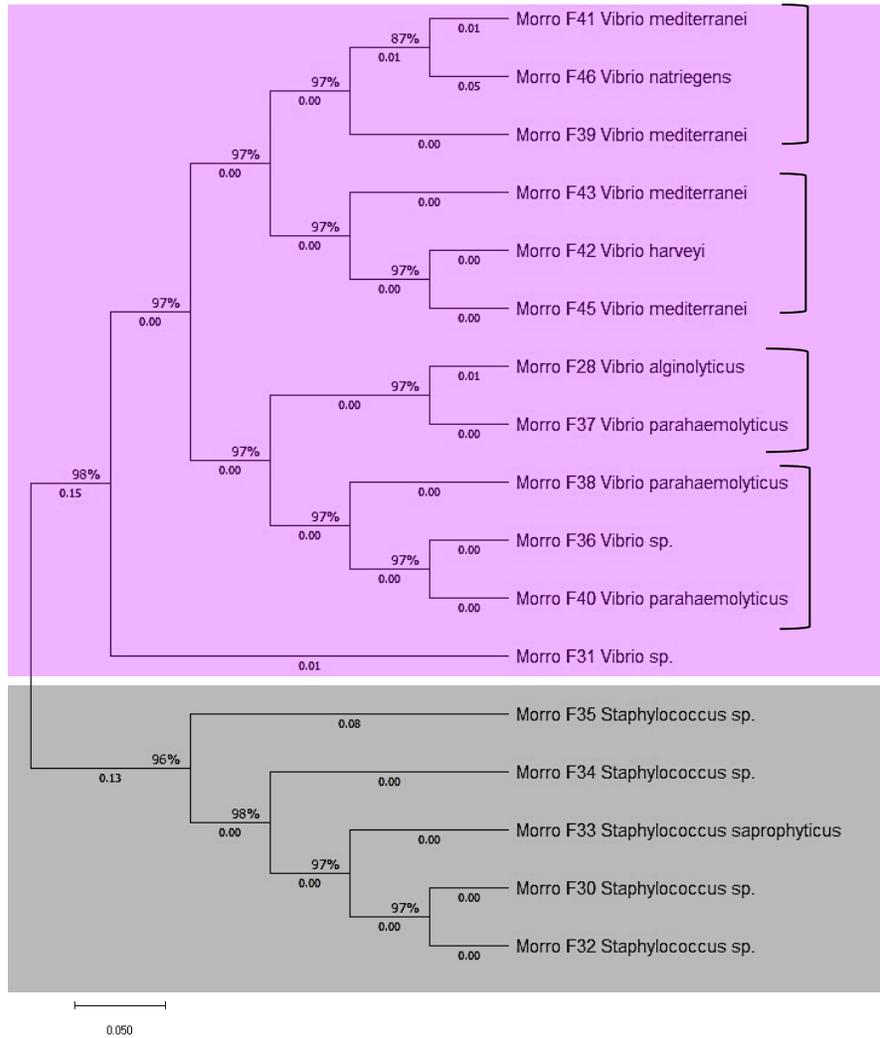
Nota. Historia evolutiva de secuencias bacterianas de la zona de Taura, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de 2 parámetros de Kimura con un Bootstrap de 500 réplicas.

Se realizó el árbol filogenético de la zona del Morro (Figura 20), se dividió en dos clados, el primer clado abarca cepas bacterianas del género *Vibrio* pertenecientes al phylum Proteobacteria, el clado se formó con un valor del Bootstrap de 98%, la especie *Vibrio mediterranei* se ubicó en dos suclados distintos, el primer subclado tiene un nivel de significancia del 97% encontrándose asociado al *Vibrio natriegens* como taxón hermano, en el segundo subclado, la especie *mediterranei* es taxón hermano del *V. harveyi* con 97% de las réplicas Bootstrap. Así mismo *V. parahaemolyticus* está relacionado como taxón hermano de *V. alginolyticus* divergiendo evolutivamente por 0,01 en la longitud de su rama en el tercer subclado, y en el cuarto subclado con 97% de valor significativo, se relacionó filogenéticamente la especie *parahaemolyticus* con *Vibrio sp.* sin existir variaciones nucleotídicas a través del tiempo en cada una de sus ramas por mantenerse en 0,0.

El segundo clado, conformado por especies bacterianas de *Staphylococcus sp.* pertenecientes al phylum Bacillota y se ha dividido en cuatro subclados con niveles de significancia entre 96% - 98%.

Figura 20.

Árbol filogenético de bacterias en la zona del Morro.



Nota. Historia evolutiva de secuencias bacterianas de la zona del Morro, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de 2 parámetros de Kimura con un Bootstrap de 500 réplicas.

La filogenia de las bacterias en el área de Sabana de Grande se refleja en la (Figura 21), el árbol se dividió en dos clados. El primer clado es un grupo monofilético, se formó con un 91% del valor estadístico Bootstrap y está conformado por el phylum Bacillota, hallándose géneros de *Staphylococcus sp.*, *Listeria sp.* y *Bacillus sp.*, las cepas de *Staphylococcus* se ubicaron en taxones hermanos distribuidas en cuatro subclados y la especie *Listeria grayi* se asoció filogenéticamente a la cepa G15 en el cuarto grupo del primer clado con un nivel de soporte del 93%, y la especie *Bacillus subtilis* divergió evolutivamente de su taxón hermano con una distancia de 0,03 en la longitud de su rama.

El segundo clado conformado por un nivel de Bootstrap del 92%, encontrándose cepas de *Vibrios sp.* y *Morganella sp.* en taxones hermanos, aunque la cepa de *Morganella sp.* haya sufrido mayores cambios evolutivos a través del tiempo distanciándose de su grupo hermano por 0,02 nucleótidos.

Se representó las relaciones evolutivas entre todas las secuencias bacterianas obtenidas en las cinco áreas de muestreo (Figura 22), se formaron dos cladogramas, el primer cladograma estaba compuesto por el phylum Pseudomonadota, Actinomycetota y Bacillota, presentó una longitud de rama 0,01 con un 82% nivel de significancia, en este cladograma se agruparon los géneros *Vibrios*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, caracterizadas por ser bacterias patógenas asociadas a mortalidades en cultivos. En el segundo cladograma se agruparon los géneros de *Staphylococcus*, *Bacillus*, esta agrupación tiene un soporte del 80% siendo significativo y una longitud de rama de 0,02 con respecto a la distancia del primer grupo, a pesar que en el segundo cladograma se asociaron cepas bacterianas del phylum Bacillota, hubo géneros que se conformaron como taxones hermanos en el primer grupo, entre ellos las cepas de *Exiguobacterium* se agruparon con un nivel de significancia del 82% en un subcladograma, las especies *Bacillus pumilis* comparte un taxón hermano con la cepa B56 *Rothia endophytica*, pero el subcladograma formado no es significativo a penas con 15%, para *Corynebacterium sp. Gulosibacter faecalis*, la cepa B56 *Rothia endophytica* y *Bachyobacterium* comparten un subcladograma con un nivel de soporte del 76%, esta agrupación antecede al subcladograma conformado por *Paracoccus sp.* y *Ochrobactrum anthropi* y con un Bootstrap del 72%. La cepa bacteriana V. *brasiliensis* antecede a *B. thuringiensis* encontrándose relacionados filogenéticamente, cada subcladograma contiene un valor estadístico de 75% y 79% respectivamente. Finalmente, las cepas de *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio* se agruparon en subcladogramas por separado con un soporte del 80%, 80% y 79% respectivamente.

Capítulo V

5.1. Discusiones

Los sistemas acuícolas se encuentran desafiados constantemente por bacterias infecciosas, la sanidad en el camarón blanco, las exportaciones e incluso la salud humana, dependen del buen manejo, control y conocimiento de agentes patógenos (Garibay-Valdez et al., 2020). Estudios previos han estimado que entre el 0,1- 1% de bacterias pueden ser cultivables (Rodrigues & de Carvalho, 2022).

De acuerdo a la región conservada v1-v9, en bacterias, la identificación de especies bacterianas en esta investigación se basó en la implementación de la secuenciación de Sanger para el análisis del *ARNr 16S*, a partir de esta investigación, se detectaron bacterias patógenas y probióticas presentes en larvas y camarones juveniles, se obtuvo mayor información de las secuencias para lograr una diferenciación taxonómica a nivel especie en su mayoría, en comparación con un estudio donde se caracterizó la diversidad bacteriana en estadios larvarios empleando tecnologías de alto rendimiento (Illumina) en regiones v3-v4, llegando mayormente a tasas de familia y género (Reyes, 2021), sin embargo, otra investigación señala, el uso y combinación de regiones específicas (V1-V2, V3-V4, V5-V7 y V7-V9) del gen *ARNr 16S* para mejorar las identificaciones bacterianas ya que las tecnologías de alto rendimiento como (Illumina) no permiten una lectura más allá de 300 pb (Varliero et al., 2023).

Es importante resaltar que ninguna región hipervariable puede discriminar entre todas las especies bacterianas, pero la utilización de primers que amplifican v1-v9 (~1500 pb) son el estándar oro, al poder proporcionar mayor información taxonómica, para análisis filogenéticos, al contrario de las amplificaciones de regiones más cortas (Bertolo et al., 2024; Rajeev et al., 2020).

En este estudio se identificaron cepas de *V. parahaemolyticus*, *V. natriegens*, *V. mediterranei*, *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. brasiliensis*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella algae*, *Listeria grayi*, *Staphylococcus sp.*, asociadas a brotes infecciosos en cultivos de camarón, la detección específica facilita el tratamiento y prevención en el manejo de la producción, sin embargo, a pesar de no estar relacionadas a patogenicidad, se han aislado bacterias probióticas en agar TCBS (Dong et al., 2020) como *Bacillus sp.*, *Exiguobacterium sp.*, y otras especies que constituyen parte de la microbiota en peces, siendo utilizadas en la piscifactorías por sus propiedades inhibitorias, los géneros que han sido detectados como probióticos en Yaguachi son *Psychrobacter sp.*, *Corynebacterium sp.* y *Brachybacterium sp.* representando 4,17% de abundancia cada una, (Makled et al., 2020; Wei et al., 2021; Yao et al., 2020) esto sugiere una contaminación en los reservorios de agua relacionada a la cercanía de cultivos de peces a las zonas de producción camaronera.

En el 2023 se realizó una investigación basada en la identificación bioquímica empleando un kit Api20NE en bacterias responsables de enfermedades en cultivos de camarón blanco en zonas productivas del Ecuador, indicando que gran parte de las

especies aisladas fueron *Aeromona hydrophila*, *P. aeruginosa*, *Shewanella putrefaciens*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Zambrano, 2023), difiriendo de este estudio, al identificar mediante secuencias bacterianas otros géneros y especies, lo que sugiere el respaldo de enfoques moleculares, debido a las limitaciones de grupos taxonómicos en la base de datos APIWEB para la identificación mediante el método tradicional de diagnóstico API20NE (Khodzori et al., 2021), llevando a identificaciones basadas en respuestas nutricionales y bioquímicas por la producción de reacciones atípicas de los géneros y especies bacterianas identificados (Khouadja et al., 2022).

Las bacterias probióticas forman parte de la constitución de un ecosistema, constituyendo la flora bacteriana en camarones, sin embargo, este estudio utilizó un agar selectivo para vibrios como es el TCBS para el aislamiento de bacterias, se encontraron cepas relacionadas a la administración de probióticos, investigaciones realizadas en Malasia, de aislados en cultivos larvarios de camarón, demostraron la presencia de cepas caracterizadas molecularmente del género *Bacillus sp.* como *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, resultando posible el crecimiento en placas de agar TCBS (Shah, 2014; Sirvas et al., 2021), esta premisa induce a la posibilidad de que ciertas bacterias probióticas encuentren la capacidad de no ser inhibidas por sales biliares, ya que las bacterias tienen propiedades enzimáticas, algunas especies del género *Bacillus* al poseer capacidad amilolítica pueden consumir la sacarosa (Sirvas et al., 2021).

En base a estas investigaciones, el agar TCBS puede inducir a sesgos en los aislamientos al permitir el crecimiento de bacterias tolerantes, esto sugiere incluso el uso de técnicas más avanzadas que las de primera generación, hablamos de metagenómica, y desde su aparición ha permitido caracterizar y analizar comunidades bacterianas de genomas sin la necesidad de aislamiento en medios de cultivo, permite conocer el potencial genético y las funciones que desempeñan las bacterias en la microbiota de los camarones (Gao et al., 2019) .

Los *Bacillus spp.* correspondieron el 20,83% de abundancia en esta investigación, hallándose *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. pumilis*, *B. tequilensis*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. zhangzhouensis*, *B. safensis* a pesar de que muchas de estas especies tienen la capacidad de producir metabolitos empleados para combatir agentes infecciosos (Alyousif, 2022), sin embargo, una indagación realizada en India relaciona a una cepa de *Bacillus cereus*, causó mortalidades del 70% en 3 días, en camarones, la cepa fue identificada fenotípica y genotípicamente y los síntomas son similares a WSSV, al producir manchas blancas en el caparazón y musculatura blanquecina (Velmurugan et al., 2015).

Entre otras bacterias identificadas en el presente estudio, *Rothia endophytica* constituye el 11,11% de abundancia en la zona de Santa Elena, es una bacteria no identificada e informada como parte de las enfermedades bacterianas en cultivos de camarón, se conoce que los miembros del género *Rothia* habitan en relaciones simbióticas en aguas residuales, oceánicas (Sokolov et al., 2021) y dentro de tejidos

vegetales sanos, además presentan genes que codifican para la descomposición de quitina de hongos, siendo aprovechados como fuentes de carbono por otros microorganismos (Oliveira et al., 2022). Esta capacidad enzimática podría influir en el microbioma de los cultivos de camarón, facilitando la descomposición de materiales orgánicos, pero es crucial considerar la posibilidad de que pueda convertirse en patógeno bajo ciertas condiciones, lo que requiere investigaciones adicionales.

En el marco de esta investigación, se han identificado las cepas bacterianas *Gulosibacter faecalis*, *Listeria grayi*, *Morganella sp.* y *Staphylococcus spp.* Estas bacterias se consideran oportunistas, pues no forman parte de la microbiota natural del medio, ya que se hallan comúnmente en las heces de animales domésticos y de humanos (Çokal et al., 2022; Li et al., 2020; Zaric et al., 2021). Se plantea que su presencia podría estar relacionada a una posible contaminación de origen antropogénico, dado que los asentamientos humanos se ubican en zonas cercanas de granjas camaroneras.

Providencia rettgeri fue detectada en la provincia de Santa Elena con 11,11% de abundancia. Aunque se sabe poco sobre esta especie en la acuicultura, una investigación sugiere que especies como *Vibrio spp.* podrían estar interactuando y compartiendo genes relacionados a la resistencia de antibióticos y virulencia, con *Providencia sp.* (Fu et al., 2022) . Y a pesar de que existen pocos reportes sobre su patogenicidad en estanques de cultivo de camarón, en 2017 se realizó un bioensayo en China, basado en la virulencia enzimática de una cepa *Providencia rettgeri*, inoculada

a concentraciones de 1.52×10^5 CFU/mL, causando de DL50 en camarones sanos (Gai et al., 2017).

5.2. Conclusiones

En base a esta investigación se logró aislar ADN de 96 especies bacterianas, lo que permitió una caracterización detallada de las bacterias presentes en los cultivos de camarón en las provincias de Guayas y Santa Elena, la extracción del ADN de las bacterias patógenas fue exitosa, obteniéndose concentraciones de ADN que oscilaron entre 4.08 ng/ μ L a 408.3 ng/ μ L. La pureza del ADN fue evaluada mediante Nanodrop tomando en cuenta las relaciones 260/280.

La amplificación del gen *ARNr 16S* mediante PCR se realizó de manera eficiente en todas las muestras, obteniendo productos de PCR de alta calidad con tamaños de banda esperados entre 1000 y 1400 pb, la técnica de PCR permitió la obtención de secuencias de alta calidad que fueron esenciales para la identificación posterior de bacterias asociadas a patogenicidad mediante herramientas bioinformáticas.

Es importante resaltar que el uso de técnicas moleculares como la secuenciación, ofreció ventajas sobre la microbiología básica y pruebas bioquímicas en la identificación bacteriana. La secuenciación en este estudio ha permitido realizar

identificaciones de bacterias con mayor precisión, además de establecer relaciones evolutivas y la diversidad genética que no pueden ser obtenidas mediante métodos convencionales.

De acuerdo con los hallazgos de la identificación de las secuencias de ADN obtenidas, se identificaron 18 géneros diferentes de bacterias presentes en las zonas muestreadas. Entre los géneros más abundantes se encontraron *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* y *Vibrio spp.*, y se construyeron árboles filogenéticos que mostraron la relación evolutiva entre las bacterias identificadas, destacando la presencia de especies relacionadas a la administración de probióticos, patogenicidad y degradativas.

La estructura del árbol filogenético muestra que hay claras diferencias en la distancia evolutiva entre los distintos géneros y especies. Las especies asociadas a patogenicidad como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas sp.*, *Shewanella algae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus sp.* fueron claramente diferenciadas en el árbol, con varias ramas largas que conectan estos distintos taxones, reflejando la profundidad evolutiva y la variedad genética presente. Estos hallazgos pudiesen indicar la capacidad de las bacterias a adaptarse a diferentes salinidades en las zonas estudiadas debido a la diversidad filogenética, respaldando la hipótesis al existir diferencias significativas en la diversidad filogenética de las bacterias asociadas a enfermedades en camarón blanco.

5.3. Recomendaciones

Se recomienda combinar técnicas moleculares con métodos tradicionales de identificación bacteriana, como pruebas fenotípicas y bioquímicas, para validar y complementar los resultados obtenidos, proporcionando una caracterización más robusta de las bacterias.

Desarrollar estudios de patogenicidad *in vivo* utilizando modelos de camarón para confirmar la virulencia de las bacterias identificadas, especialmente aquellas relacionadas con la contaminación antropogénica, estos estudios deben incluir la caracterización de posibles genes de toxinas que puedan perjudicar el equilibrio de las comunidades bacterianas. Este enfoque permitirá evaluar el impacto real de las bacterias en condiciones controladas, proporcionando información crítica sobre su patogenicidad y sus efectos en los ecosistemas acuáticos.

Utilizar técnicas de secuenciación de nueva generación para realizar análisis metagenómicos que permitan identificar bacterias no cultivables y comprender mejor las interacciones microbianas y su impacto en la salud de los camarones.

5.4. Bibliografía

- Alyousif, N. A. (2022). Distribution, occurrence and molecular characterization of *Bacillus* related species isolated from different soil in Basrah Province, Iraq. *Biodiversitas*, 23(2), 679–686. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230209>
- Amatul-Samahah, M. A., Wan Omar, W. H. H., Mohd Ikhsan, N. F., Amal Azmai, M. N., Zamri-Saad, M., & Ina-Salwany, M. Y. (2020). Vaccination trials against vibriosis in shrimp: A review. In *Aquaculture Reports* (Vol. 18). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100471>
- Aranguren, L. F., Briñez, B., Aragón, L., Platz, C., Caraballo, X., Suarez, A., & Salazar, M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: Effect on reproductive parameters, nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, 258(1–4), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.051>
- Bardera, G., Usman, N., Owen, M., Pountney, D., Sloman, K. A., & Alexander, M. E. (2019). The importance of behaviour in improving the production of shrimp in aquaculture. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 11, Issue 4, pp. 1104–1132). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12282>
- Bartell, J. A., Sommer, L. M., Haagensen, J. A. J., Loch, A., Espinosa, R., Molin, S., & Johansen, H. K. (2019). Evolutionary highways to persistent bacterial infection. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08504-7>
- Bell, T., & Lightner, D. (1988). A handbook of normal Penaeid shrimp histology. *World Aquaculture Society*.
- Bertolo, A., Valido, E., & Stoyanov, J. (2024). Optimized bacterial community characterization through full-length 16S rRNA gene sequencing utilizing MinION nanopore technology. *BMC Microbiology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03208-5>
- Bondad, M., & Arthur, R. (2018). FAO Technical Assistance Efforts to Deal with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Cultured Shrimp. *Asian Fisheries Science*, 31, 01–14.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011a). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8, pp. 601–608). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011b). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8, pp. 601–608). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

- Chandrakala, N., & Priya, S. (2017). *Vibriosis in Shrimp Aquaculture A Review*. 2(2), 27–33.
- Chen, Y., Liu, Y., Shi, Y., Ping, J., Wu, J., & Chen, H. (2020). Magnetic particles for integrated nucleic acid purification, amplification and detection without pipetting. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115912.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115912>
- Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 33, Issue 4, pp. 1–74). American Society for Microbiology.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>
- CNA. (2024). *Camarón - Reporte de Exportaciones Ecuatorianas Totales*. Cámara Nacional de Acuicultura.
- Çokal, Y., Günadyn, E., & GoncaçüL, G. (2022). The investigation of the presence of *Listeria* species in poultry farms and antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 6(1), 26–34.
<https://doi.org/10.30704/http-www-jivs-net.1075016>
- Dairawan, M., & Shetty, P. J. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 8(1), 39–45.
<https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.08.001234>
- De Cario, R., Kura, A., Suraci, S., Magi, A., Volta, A., Marcucci, R., Gori, A. M., Pepe, G., Giusti, B., & Sticchi, E. (2020). Sanger Validation of High-Throughput Sequencing in Genetic Diagnosis: Still the Best Practice? *Frontiers in Genetics*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.592588>
- de Souza Valente, C., & Wan, A. H. L. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>
- Deng, Y., Xu, H., Su, Y., Liu, S., Xu, L., Guo, Z., Wu, J., Cheng, C., & Feng, J. (2019). Horizontal gene transfer contributes to virulence and antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* 345 based on complete genome sequence analysis. *BMC Genomics*, 20(1), 2–19.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6137-8>
- Dong, Y., Zhao, P., Chen, L., Wu, H., Si, X., Shen, X., Shen, H., Qiao, Y., Zhu, S., Chen, Q., Jia, W., Dong, J., Li, J., & Gao, S. (2020). Fast, simple and highly specific molecular detection of *Vibrio alginolyticus* pathogenic strains using a visualized isothermal amplification method. *BMC Veterinary Research*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02297-4>
- FAO. (2023). *La producción mundial de camarón de cultivo aumentó en 2022 a pesar de la baja demanda*. GLOBEFISH.

- Franco, A., Rückert, C., Blom, J., Busche, T., Reichert, J., Schubert, P., Goesmann, A., Kalinowski, J., Wilke, T., Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2020). High diversity of *Vibrio* spp. associated with different ecological niches in a marine aquaria system and description of *Vibrio aquimaris* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(5). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126123>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Tintino, S. R., de Souza, V. C. A., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. In *Microorganisms* (Vol. 7, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Fu, S., Wang, Q., Wang, R., Zhang, Y., Lan, R., He, F., & Yang, Q. (2022). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes within the bacterial communities in aquacultural environment. *Science of The Total Environment*, 820, 153286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153286>
- Gai, C., Ou, R., Lu, L., Yang, X., & Cao, H. (2017). *Providencia rettgeri*: an Emerging Pathogen for Freshwater Cultured Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei*). In *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. <http://www.siamb.org.il>.
- Gao, S., Pan, L., Huang, F., Song, M., Tian, C., & Zhang, M. (2019). Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 499, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.026>
- Garibay-Valdez, E., Martínez-Porchas, M., Calderón, K., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., & Arvayo, M. A. (2020). *La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte The gut microbiota of penaeid shrimp: a historical perspective and state of the art*. <http://biotecnia.unison.mx>
- Ghaheri, M., Kahrizi, D., Yari, K., Babaie, A., Suthar, R. S., & Kazemi, E. (2016). A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cellular and Molecular Biology*, 62(3), 120–124. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.3.20>
- Gonzabay-Crespin, N., Vite-Cevallos, H., Garzón-Montenegro, V., & Quizhpe-Cordero, P. (2021). Análisis de la producción de camarón en el Ecuador para su exportación a la Unión Europea en el período 2015-2020. *Polo Del Conocimineto*, 6(1040–1058, ISSN: 2550-682X), 1041–1058.
- Govindan, S. (2019). *Isolation, Charaterization and Molecular Identification of Vibrio Harveyi from Moribund Farm Shrimps in Puducherry, India*. <https://www.researchgate.net/publication/335378054>

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), 436–456. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Hikmawati, F., Susilowati, A., & Setyaningsih, R. (2019). Colony morphology and molecular identification of *Vibrio* spp. On green mussels (*Perna Viridis*) in Yogyakarta, Indonesia tourism beach areas. *Biodiversitas*, 20(10), 2891–2899. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201015>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Jäckel, C., Hammerl, J. A., Arslan, H. H. T., Göllner, C., Ort, N. Vom, Taureck, K., & Strauch, E. (2020). Phenotypic and genotypic characterization of veterinary vibrio cincinnatiensis isolates. *Microorganisms*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050739>
- Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>
- Kang, G., Choi, K. M., Joo, M. S., Woo, W. S., & Park, C. Il. (2022). A case report of secondary infection by *Vibrio splendidus* associated with gas bubble disease in syngnathid fishes (*Syngnathus schlegeli* and *Hippocampus haema*). *Fisheries and Aquatic Sciences*, 25(1), 40–48. <https://doi.org/10.47853/FAS.2022.e5>
- Keklik, G. (2023). Understanding Evolutionary Relationships and Analysis Methods through MEGA Software. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NEW HORIZONS IN THE SCIENCES (JIHSCI)*, 1. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10446714>
- Khodzori, F. A., Saad, S., Mansor, N. N., Nasir, N. A. N. M., Khalid, N. N. N. A., & Rawi, F. Z. (2021). Pathogenic *Vibrio* spp. identified for white syndrome coral disease in Tioman Island Marine Park, Malaysia. *Malaysian Journal of Microbiology*, 17(1), 69–79. <https://doi.org/10.21161/mjm.200859>
- Khouadja, S., Roque, A., Gonzalez, M., & Furones, D. (2022). *Vibrio* pathogenicity island and phage CTX genes in *Vibrio alginolyticus* isolated from different aquatic environments. *Journal of Water and Health*, 20(10), 1469–1478. <https://doi.org/10.2166/wh.2022.029>
- Kozińska, A., Seweryn, P., & Sitkiewicz, I. (2019). A crash course in sequencing for a microbiologist. In *Journal of Applied Genetics* (Vol. 60, Issue 1, pp. 103–111). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00482-2>
- Kumar, R., Hann, T., & Wang, H. C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 12, Issue 3, pp. 1867–1880). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12414>

- Kumar, S., & Kumar, P. (2012). *Training Programme on Management of Emerging Diseases of Shrimp with Special Reference to Pacific White Shrimp, Litopenaeus vannamei* (K. Jithendran, Ed.).
- Leunda, A., Bunin, E., Arrufat, P., Pearman, P. B., & Kaberdin, V. R. (2024). Harnessing the intragenomic variability of rRNA operons to improve differentiation of *Vibrio* species. *Scientific Reports*, *14*(1), 9908. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60505-9>
- Leyva, J. M., Martínez-Porchas, M., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F., & Gollas-Galván, T. (2018). Identifying the causal agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp: Multilocus sequence analysis approach. *Aquaculture Research*, *49*(5), 1795–1802. <https://doi.org/10.1111/are.13633>
- Li, G., Li, Q., Chen, X., Jiang, L., Zhang, K., An, D., Lang, L., Jiang, Y., Han, L., Huang, X., & Jiang, C. (2020). *Gulosibacter macacae* sp. Nov., a novel actinobacterium isolated from macaca mulatta faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(9), 5115–5122. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004389>
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, *164*(1), 201–220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)
- Liu, W., Ou, P., Tian, F., Liao, J., Ma, Y., Wang, J., & Jin, X. (2023). Anti-*Vibrio* para-haemolytic compounds from *Streptomyces parvus* based on Pan-genome and subtractive proteomics. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1218176>
- Loo, K. Y., Law, J. W. F., Tan, L. T. H., Pusparajah, P., Letchumanan, V., & Lee, L. H. (2022). Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio* species. In *Aquaculture* (Vol. 561). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738628>
- Makled, S. O., Hamdan, A. M., & El-Sayed, A.-F. M. (2020). Growth Promotion and Immune Stimulation in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fingerlings Following Dietary Administration of a Novel Marine Probiotic, *Psychrobacter maritimus* S. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *12*(2), 365–374. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09575-0>
- Melo-Bolívar, J. F., Pardo, R. Y. R., Junca, H., Sidjabat, H. E., Cano-Lozano, J. A., & Díaz, L. M. V. (2022). Competitive Exclusion Bacterial Culture Derived from the Gut Microbiome of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as a Resource to Efficiently Recover Probiotic Strains: Taxonomic, Genomic, and Functional Proof of Concept. *Microorganisms*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071376>
- Monsalve, E. R., & Quiroga, E. (2022). Farmed shrimp aquaculture in coastal wetlands of Latin America — A review of environmental issues. *Marine Pollution Bulletin*, *183*, 113956. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113956>

- Morales, M., Cuéllar, J., Varela, A., & Elizondo, C. (2018). Shrimp Bacterial Infections in Latin America: A Review. *Asian Fisheries Science*, *31*(S), 76–78.
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Ina-Salwany, M. Y., Yusoff, F. M., Shariff, M., Ismail, S. I., & Natrah, I. (2019). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture*, *511*.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734227>
- Oliveira, I. M. F. de, Ng, D. Y. K., Baarlen, P. van, Stegger, M., Andersen, P. S., & Wells, J. M. (2022). Comparative genomics of *Rothia* species reveals diversity in novel biosynthetic gene clusters and ecological adaptation to different eukaryotic hosts and host niches. *Microbial Genomics*, *8*(9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000854>
- Orondo, P. W., Ochwedo, K. O., Atieli, H., Yan, G., Githeko, A. K., & Nyanjom, S. G. (2023). Effects of bacterial composition and aquatic habitat metabolites on malaria vector larval availability in irrigated and non-irrigated sites of Homa Bay county, western Kenya. *PLoS ONE*, *18*(6 June). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286509>
- Padilla, M. (2005). *Caracterización de la Comunidad Bacteriana Presente en Cultivo de Camarón Litopenaeus vannamei, Utilizando Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) y PCR*.
- Panda, B. B., Meher, A. S., & Hazra, R. K. (2019). Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness. In *Journal of Parasitic Diseases* (Vol. 43, Issue 3, pp. 337–342). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01136-0>
- Peker, N., Garcia-Croes, S., Dijkhuizen, B., Wiersma, H. H., Van Zanten, E., Wisselink, G., Friedrich, A. W., Kooistra-Smid, M., Sinha, B., Rossen, J. W. A., & Couto, N. (2019a). A comparison of three different bioinformatics analyses of the 16S-23S rRNA encoding region for bacterial identification. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00620>
- Peker, N., Garcia-Croes, S., Dijkhuizen, B., Wiersma, H. H., Van Zanten, E., Wisselink, G., Friedrich, A. W., Kooistra-Smid, M., Sinha, B., Rossen, J. W. A., & Couto, N. (2019b). A comparison of three different bioinformatics analyses of the 16S-23S rRNA encoding region for bacterial identification. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00620>
- Priyam, A., Woodcroft, B. J., Rai, V., Moghul, I., Munagala, A., Ter, F., Chowdhary, H., Pieniak, I., Maynard, L. J., Gibbins, M. A., Moon, H. K., Davis-Richardson, A., Uludag, M., Watson-Haigh, N. S., Challis, R., Nakamura, H., Favreau, E., Gómez, E. A., Pluskal, T., ... Wurm, Y. (2019). Sequenceserver: A Modern Graphical User Interface for Custom BLAST Databases. *Molecular Biology and Evolution*, *36*(12), 2922–2924. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz185>

- Rajeev, M., Sushmitha, T. J., Toleti, S. R., & Pandian, S. K. (2020). Sediment-associated bacterial community and predictive functionalities are influenced by choice of 16S ribosomal RNA hypervariable region(s): An amplicon-based diversity study. *Genomics*, *112*(6), 4968–4979. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.006>
- Reyes, G. (2021). *Caracterización de la microbiota de cultivos larvarios de Penaeus vannamei afectados con la Enfermedad de la Necrosis Aguda Hepatopancreática (AHPND)*. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Reyes, G., Andrade, B., Betancourt, I., Panchana, F., Solórzano, R., Preciado, C., Sorroza, L., Trujillo, L. E., & Bayot, B. (2023). Microbial signature profiles of *Penaeus vannamei* larvae in low-survival hatchery tanks affected by vibriosis. *PeerJ*, *9*. <https://doi.org/10.7717/peerj.15795>
- Rodrigues, C. J. C., & de Carvalho, C. C. C. R. (2022). Cultivating marine bacteria under laboratory conditions: Overcoming the “unculturable” dogma. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.964589>
- Saavedra-Olivos, K. Y., Peralta-Ortiz, T., Ordinola-Zapata, A., Sandoval-Ramayoni, J. E., Vieyra-Peña, E. G., Zapata-Cruz, M. A., Hidalgo-Mogollón, A., Morán-Ávila, B., Mendoza-Neyra, O. A., Mendoza-Dioses, M. E., & Campoverde-Peña, S. Y. (2018). Detection of a protein associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *litopenaeus vannamei* under semi-intensive farming in Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *29*(1), 328–338. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14194>
- Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J., & Fabre, P. P. (2023). What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences*, *11*(3). <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hottton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O’Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. In *Database* (Vol. 2020). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Shah, S. (2014). *Identification of Bacteria Isolated on TCBS agar from White-leg Shrimp Litopenaeus vannamei Cultured in the West Coast of Peninsular Malaysia*. University Malaysia Terengganu.
- Sharma, N., Sharma, N., Sharma, S., Sharma, P., & Devi, B. (2023). Identification, morphological, biochemical, and genetic characterization of microorganisms. In A. K. Bhatt, R. K. Bhatia, & T. C. Bhalla (Eds.), *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* (pp. 47–84). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00003-9>

- Shin, H. S., Montachana Chimborazo, M. E., Escobar Rivas, J. M., Lorenzo-Felipe, Á., Martínez Soler, M., Zamorano Serrano, M. J., Fernández Martín, J., Ramírez Artiles, J. S., Peñate Sánchez, A., Lorenzo Navarro, J., Intriago Díaz, W., Torres, R., Reyes Abad, E., & Afonso López, J. M. (2023). Genetic parameters for growth and morphological traits of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* from a selective breeding programme in the industrial sector of Ecuador. *Aquaculture Reports*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101649>
- Sirvas, S., Buleje, V., Salvatierra, L., & Jaramillo, M. L. (2021). Isolation and identification of proteolytic, amylolytic, lipolytic, and chitinolytic bacteria from shrimp waste. *Revista Peruana de Biología*, 28(1). <https://doi.org/10.15381/RPB.V28I1.18353>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Sokolov, A., Dykman, L., Galitskaya, A., & Sokolov, O. (2021). *Identification and Characterization of Rothia amarae sp. nov. in a Suspension Culture of Arabidopsis thaliana (Heynh.) Cells*. 92. <https://doi.org/10.3390/iecps2020-08753>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Aguilar-Rendón, K. G., & González-Gómez, J. P. (2024). Identification of new *Vibrio campbellii* strains harboring the pVA1 plasmid isolated from *Penaeus vannamei* postlarvae affected by outbreaks of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Aquaculture*, 579, 740221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740221>
- Tarh, J. (2020). A Review on Diagnostic Methods for the Identification of *Vibrio cholerae*. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 136–164. <https://doi.org/10.9734/jammr/2020/v32i830474>
- Tedeschi, R., & De Paoli, P. (2011). Collection and Preservation of Frozen Microorganisms. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 675, pp. 313–326). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-423-0_18
- Thompson, C. C., Vicente, A. C. P., Souza, R. C., Vasconcelos, A. T. R., Vesth, T., Alves, N., Ussery, D. W., Iida, T., & Thompson, F. L. (2009). Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-258>
- Varliero, G., Lebre, P. H., Stevens, M. I., Czechowski, P., Makhalanyane, T., & Cowan, D. A. (2023). The use of different 16S rRNA gene variable regions in biogeographical studies. *Environmental Microbiology Reports*, 15(3), 216–228. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13145>
- Velmurugan, S., Palanikumar, P., Velayuthani, P., Donio, M. B. S., Babu, M. M., Lelin, C., Sudhakar, S., & Citarasu, T. (2015). Bacterial white patch disease caused by *Bacillus cereus*, a new emerging disease in semi-intensive culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 444, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.017>

- Villarreal, H. (2023). Shrimp farming advances, challenges, and opportunities. In *Journal of the World Aquaculture Society* (Vol. 54, Issue 5, pp. 1092–1095). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jwas.13027>
- Wei, Y., Bu, J., Long, H., Zhang, X., Cai, X., Huang, A., Ren, W., & Xie, Z. (2021). Community Structure of Protease-Producing Bacteria Cultivated From Aquaculture Systems: Potential Impact of a Tropical Environment. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638129>
- Yang, H., He, D., Liu, C., Zhang, T., Qu, J., Jin, D., Zhang, K., Lv, Y., Zhang, Z., & Zhang, Y. (2022). Visible-light-driven photocatalytic disinfection by S-scheme α -Fe₂O₃/g-C₃N₄ heterojunction: Bactericidal performance and mechanism insight. *Chemosphere*, *287*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132072>
- Yang, R., Liu, Q., He, Y., Tao, Z., Xu, M., Luo, Q., Chen, J., & Chen, H. (2020). Isolation and identification of *Vibrio mediterranei* 117-T6 as a pathogen associated with yellow spot disease of *Pyropia* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, *526*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735372>
- Yao, C., Sano, M., Dan, S., Leelakriangsak, M., & Lal, T. (2020). Postbiotics Applications as Infectious Disease Control Agent in Aquaculture. *Biocontrol Science*, *25*, 1–17.
- Yen, P. T. H., Linh, N. Q., & Tram, N. D. Q. (2021). The identification and determination of toxin genes of *Vibrio* strains causing hemorrhagic disease on red drum (*Sciaenops ocellatus*) using PCR. *AMB Express*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01161-w>
- Yu, Y.-B., Choi, J.-H., Kang, J.-C., Kim, H. J., & Kim, J.-H. (2022). Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review. *Microbial Pathogenesis*, *166*, 105545. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105545>
- Zambrano, C. (2023). *Aislamiento y Caracterización de Bacterias Responsables de Enfermedades en el Camarón *Penaeus vannamei*, Determinando su Caracterización Bioquímica y su Respuesta a la Susceptibilidad a Diferentes Productos Comerciales*. Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Zaric, R. Z., Jankovic, S., Zaric, M., Milosavljevic, M., Stojadinovic, M., & Pejicic, A. (2021). Antimicrobial treatment of *Morganella morganii* invasive infections: Systematic review. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *39*(4), 404–412. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.06.005>
- Zhang, R. Y., Zou, B., Yan, Y. W., Jeon, C. O., Li, M., Cai, M., & Quan, Z. X. (2020). Design of targeted primers based on 16S rRNA sequences in meta-transcriptomic datasets and identification of a novel taxonomic group in the Asgard archaea. *BMC Microbiology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-1707-0>

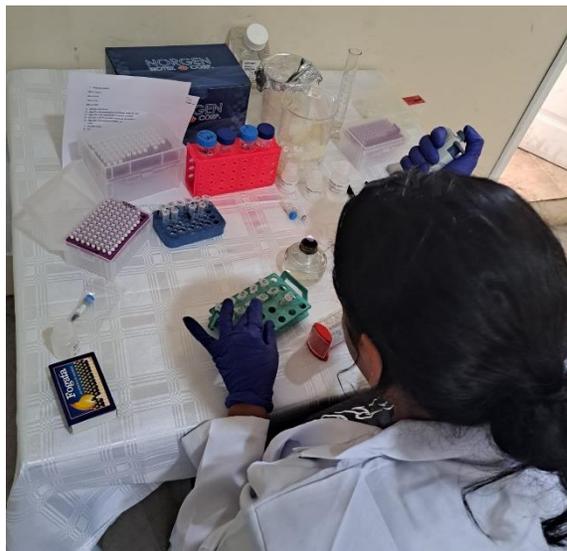
- Zhang, X. H., Ahmad, W., Zhu, X. Y., Chen, J., & Austin, B. (2021). Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. In *Marine Life Science and Technology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 189–203). Springer. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00041-3>
- Zupičić, I. G., Oraić, D., Križanović, K., & Zrnčić, S. (2024). Whole genome sequencing of *Vibrio harveyi* from different sites in the Mediterranean Sea providing data on virulence and antimicrobial resistance genes. *Aquaculture*, 581. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740439>

5.5. Anexos

Anexo 1. Aislamiento de colonias en agar TSA.



Anexo 2. Extracción de ADN empleando un kit



Anexo 3. Cuantificación de extracciones ADN en Nanodrop.

Muestra#	Fecha extracción	Fecha de medición	Nanodrop		
			ng/uL	260/280	260/230
B02	31-ene-24	29-ene-24	4,7	0,98	0,31
B04	31-ene-24	29-ene-24	22,2	1,81	1,13
B05	31-ene-24	29-ene-24	3,4	1,23	0,35
B06	31-ene-24	29-ene-24	25,5	1,87	0,99
B07	31-ene-24	29-ene-24	8,2	1,51	0,51
B08	31-ene-24	7-feb-24	8,7	0,71	0,16
B12	1-feb-24	7-feb-24	13,9	0,55	0,11
B13	1-feb-24	12-abr-24	12,7	1,63	0,54
B14	1-feb-24	7-feb-24	65,5	1,73	0,86
B15	1-feb-24	7-feb-24	14,6	0,66	0,14
B16	1-feb-24	7-feb-24	9,9	0,73	0,17
B17	1-feb-24	7-feb-24	22,8	0,9	0,29
B18	1-feb-24	7-feb-24	11,3	1,06	0,37
B19	1-feb-24	7-feb-24	14,2	0,81	0,19
B24	1-feb-24	7-feb-24	20,8	1,5	0,92
B25	1-feb-24	7-feb-24	84,8	1,87	1,22
B28	1-feb-24	7-feb-24	16,2	1,43	0,62
B31	1-feb-24	7-feb-24	9,6	1,23	0,45
B32	1-feb-24	7-feb-24	28,4	1,44	0,55
B33	1-feb-24	7-feb-24	20,1	0,73	0,15
B34	2-feb-24	7-feb-24	13,4	0,9	0,24
B39	2-feb-24	7-feb-24	20,5	1,34	0,6
B41	2-feb-24	7-feb-24	12,1	1,38	0,84
B42	2-feb-24	7-feb-24	27,8	2,05	2,4
B44	2-feb-24	7-feb-24	27	1,33	0,6
B46	2-feb-24	7-feb-24	6	1,19	0,62
B47	2-feb-24	7-feb-24	8,5	1,26	0,63
B49	2-feb-24	7-feb-24	49,3	1,49	0,74
B50	5-feb-24	12-abr-24	41,5	1,51	0,76
B52	5-feb-24	7-feb-24	37,3	1,38	0,62

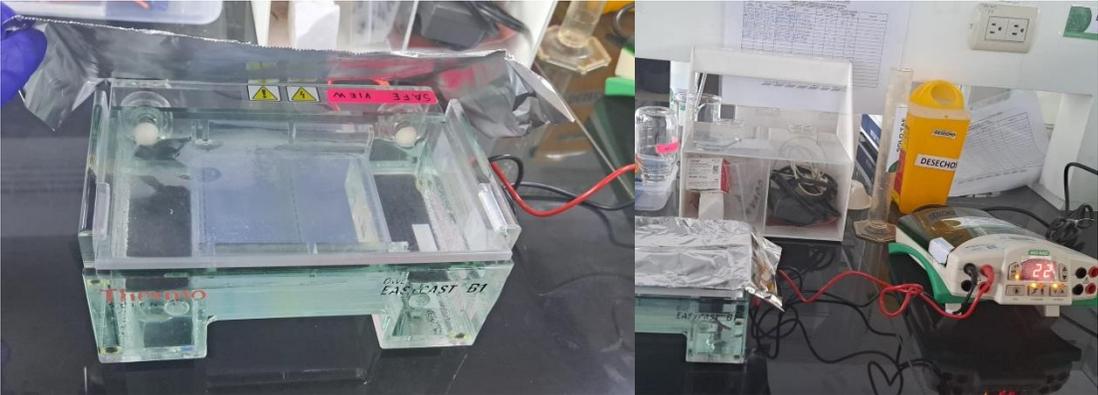
B54	5-feb-24	7-feb-24	8,4	1,44	1,03
B56	5-feb-24	7-feb-24	13,4	1,51	1,29
B57	5-feb-24	7-feb-24	11,2	1,13	0,58
B58	5-feb-24	7-feb-24	102,6	1,96	1,43
B62	5-feb-24	7-feb-24	151,2	2,14	2,42
B63	5-feb-24	7-feb-24	83,7	2,06	2,01
C02	6-feb-24	7-feb-24	0,4	0,39	1,96
C04	6-feb-24	7-feb-24	11,1	1,38	0,85
C08	6-feb-24	7-feb-24	5,7	0,73	0,17
C10	6-feb-24	7-feb-24	4,6	0,76	0,21
D01	7-abr-24	12-abr-24	14	1,89	0,83
D05	8-feb-24	4-abr-24	63	2,07	1,71
E02	15-feb-24	4-abr-24	9,1	2,54	0,72
E04	7-feb-24	7-feb-24	30,1	1,89	1,56
E05	7-feb-24	7-feb-24	52,9	1,93	2,01
E06	7-feb-24	7-feb-24	63,5	1,58	0,86
F01	7-feb-24	4-abr-24	26,4	1,32	0,43
F04	7-feb-24	7-feb-24	192,7	1,27	0,66
F06	7-feb-24	7-feb-24	57	1,48	0,56
F07	7-feb-24	7-feb-24	49,2	1,29	0,66
F08	7-feb-24	4-abr-24	13,9	1,51	0,68
F09	7-abr-24	4-abr-24	18,6	1,38	0,59
F10	7-feb-24	4-abr-24	12,9	1,32	0,34
F11	7-feb-24	4-abr-24	5,6	2,2	0,44
F12	7-feb-24	4-abr-24	57,5	1,32	0,6
F13	7-feb-24	4-abr-24	133,3	1,3	0,65
F17	7-feb-24	4-abr-24	16,3	1,35	0,66
F18	7-feb-24	4-abr-24	23,8	1,15	0,6
F20	6-abr-24	12-abr-24	23,8	1,15	0,6
F25	7-feb-24	4-abr-24	14,6	1,57	0,95
F26	6-abr-24	12-abr-24	26,7	1,16	0,57
F27	7-feb-24	4-abr-24	61	1,35	0,71
F28	7-feb-24	4-abr-24	11,3	1,34	0,65
F30	8-feb-24	4-abr-24	8,5	1,36	0,31
F31	8-feb-24	4-abr-24	42	1,32	0,39
F32	8-feb-24	4-abr-24	2	2,62	0,42

F33	8-feb-24	4-abr-24	408,3	1,32	0,64
F34	8-feb-24	4-abr-24	15,7	1,3	0,64
F35	8-feb-24	4-abr-24	3,8	2,23	0,57
F36	8-feb-24	4-abr-24	17,6	1,75	1,12
F37	8-feb-24	4-abr-24	80,3	1,38	0,64
F38	8-feb-24	4-abr-24	4,3	1,41	0,36
F39	8-feb-24	4-abr-24	58,4	1,39	0,79
F40	8-feb-24	4-abr-24	40,7	2,01	1,47
F41	8-feb-24	4-abr-24	35	1,78	0,9
F42	8-feb-24	4-abr-24	15,1	1,7	0,64
F43	8-feb-24	4-abr-24	17	2,18	1,59
F45	8-feb-24	4-abr-24	141,6	2,07	1,72
F46	8-feb-24	4-abr-24	84,5	2,03	1,5
G01	4-abr-24	12-abr-24	70,6	1,18	0,56
G02	7-abr-24	12-abr-24	4,2	1,25	0,23
G03	4-abr-24	12-abr-24	2,4	1,37	0,22
G04	4-abr-24	12-abr-24	43,8	0,99	0,35
G05	4-abr-24	12-abr-24	8,3	0,81	0,19
G06	4-abr-24	12-abr-24	96,6	1,2	0,58
G07	4-abr-24	12-abr-24	14,1	1,15	0,44
G08	4-abr-24	12-abr-24	22,6	1,32	0,46
G09	15-feb-24	4-abr-24	43,1	1,34	0,7
G10	15-feb-24	4-abr-24	332,3	1,28	0,67
G11	15-feb-24	4-abr-24	13	1,25	0,46
G12	15-feb-24	4-abr-24	15	1,38	0,4
G13	15-feb-24	4-abr-24	77,1	1,31	0,66
G14	15-feb-24	4-abr-24	157,1	1,27	0,67
G15	15-feb-24	4-abr-24	35,3	1,28	0,67
G16	15-feb-24	4-abr-24	3,4	1,39	0,35
G17	15-feb-24	4-abr-24	48,4	1,75	0,92

Anexo 4. Empleo del GoTaq para la ejecución de la PCR.



Anexo 5. Migraciones de pb en la cámara de electroforesis



Anexo 6. Tabla de Identificación Bacteriana en el BLAST

Zona	Código	Placa	Tamaño pb	Calidad	Organismo	BLAST			
						# Accesoión	Quer y	E-value	% Indentity
Yaguachi	B04	A02	1256	Buena	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MH547409. 1	99%	0.0	98.07%
Yaguachi	B05	A03	1257	Buena	<i>Pseudomonas sp.</i>	KX989279. 1	100%	0.0	86.73
Yaguachi	B06	A04	1272	Buena	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MF138118. 1	99%	0.0	96.65%
Yaguachi	B07	A05	1245	Buena	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MH384990. 1	100%	0.0	98.69%
Yaguachi	B08	A06	1206	Buena	<i>Corynebacterium sp.</i>	MH518255. 1	99%	0.0	96.66%
Yaguachi	B12	A07	1219	Baja	<i>Gulosibacter faecalis</i>	OQ581828. 1	100%	0.0	98.90%
Yaguachi	B13	A08	1249	Buena	<i>Shewanella algae</i>	MH040957. 1	100%	0.0	98.25%
Yaguachi	B14	A09	1211	Buena	<i>Shewanella sp.</i>	KU534582. 1	99%	0.0	98.95%
Yaguachi	B15	A10	1221	Buena	<i>Bacillus tequilensis</i>	OP435776. 1	99%	0.0	97.05%
Yaguachi	B16	A11	1066	Baja	<i>Exiguobacterium profundum</i>	OR687223. 1	97%	0.0	87.23%
Yaguachi	B17	A12	1108	Baja	<i>Exiguobacterium profundum</i>	MK934558. 1	100%	0.0	99.82%
Yaguachi	B18	B01	1247	Buena	<i>Exiguobacterium profundum</i>	OP263689. 1	100%	0.0	98.55%
Yaguachi	B19	B02	1449	Baja	<i>Psychrobacter sp.</i>	KP639174. 1	97%	0.0	95.72%
Yaguachi	B24	B03	1350	Baja	<i>Pseudomonas sp.</i>	MN309896. 1	100%	0.0	99.53%

Yaguachi	B28	B05	1282	Buena	<i>Brachybacterium sp.</i>	EU429507.1	97%	0.0	95.89%
Yaguachi	B31	B06	1273	Buena	<i>Bacillus cereus</i>	KY622217.1	99%	0.0	99.04%
Yaguachi	B32	B07	1240	Buena	<i>Bacillus cereus</i>	MH552993.1	99%	0.0	98.69
Yaguachi	B33	B08	1248	Buena	<i>Bacillus cereus</i>	MH552993.1	100%	0.0	98.96%
Yaguachi	B34	B09	1222	Buena	<i>Brachybacterium sp.</i>	KU560279.1	100%	0.0	98.33%
Yaguachi	B39	B10	1118	Baja	<i>Bacillus anthracis</i>	KX867803.1	95%	0.0	89.92%
Yaguachi	B41	B11	1155	Buena	<i>Bacillus cereus</i>	MN197732.1	100%	0.0	99.65%
Yaguachi	B42	B12	1190	Buena	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	LT160845.1	98%	0.0	97.11%
Santa Elena	B47	C03	1294	Buena	<i>Exiguobacterium profundum</i>	MW577384.1	100%	0.0	95.55%
Santa Elena	B49	C04	1281	Buena	<i>Exiguobacterium sp.</i>	KT027742.1	100%	0.0	97.39%
Santa Elena	B50	C05	1278	Buena	<i>Rothia endophytica</i>	MH844966.1	95%	0.0	97.34%
Santa Elena	B52	C06	1299	Buena	<i>Bacillus subtilis</i>	CP133703.1	100%	0.0	97.02%
Santa Elena	B54	C07	1280	Buena	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KY622976.1	100%	0.0	98.16%
Santa Elena	B57	C09	1236	Buena	<i>Exiguobacterium profundum</i>	MK934558.1	96%	0.0	99.02%
Santa Elena	B58	C10	1223	Buena	<i>Providencia rettgeri</i>	MN833613.1	99%	0.0	98.74%
Santa Elena	B62	C11	1174	Buena	<i>Providencia rettgeri</i>	MN589673.1	99%	0.0	98.91%
Santa Elena	B66	C12	1100	Baja	<i>Pseudomonas sp.</i>	MT043878.1	100%	0.0	85.46%
Santa Elena	C03	D01	1217	Buena	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KM191324.1	100%	0.0	97.56%

Santa Elena	C04	D02	1298	Buena	<i>Bacillus safensis</i>	MT383658.1	100%	0.0	98.53%
Santa Elena	C08	D03	1275	Buena	<i>Bacillus safensis</i>	MT501806.1	100%	0.0	97.04%
Santa Elena	C10	D04	1289	Baja	<i>Bacillus sp.</i>	MK490761.1	98%	0.0	99.18%
Santa Elena	D01	D05	1297	Buena	<i>Bacillus sp.</i>	MH769165.1	100%	0.0	98.49%
Taura	E02	D07	1301	Buena	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CP051111.1	100%	0.0	96.21%
Taura	E04	D08	1278	Buena	<i>Bacillus cereus</i>	MH552993.1	100%	0.0	99.05%
Taura	E05	D09	1249	Buena	<i>Shewanella algae</i>	MH040957.1	100%	0.0	98.84%
Taura	E06	D10	1229	Buena	<i>Shewanella algae</i>	KX455851.1	100%	0.0	97.92%
Taura	F01	D11	1172	Buena	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	JN108879.1	100%	0.0	96.91%
Taura	F04	D12	1029	Buena	<i>Priestia aryabhatai</i>	OP060816.1	99%	0.0	99.50%
Taura	F07	E02	1275	Buena	<i>Shewanella algae</i>	KU534547.1	97%	0.0	97.67%
Taura	F08	E03	1290	Buena	<i>Vibrio cholerae</i>	MW165390.1	98%	0.0	97.19%
Taura	F09	E04	1294	Buena	<i>Exiguobacterium sp.</i>	KJ456588.1	99%	0.0	98.32%
Taura	F11	E06	1279	Buena	<i>Exiguobacterium sp.</i>	MG867507.1	100%	0.0	83.20%
Taura	F12	E07	889	Baja	<i>Staphylococcus sp.</i>	JF221382.1	96%	0.0	91.02%
Taura	F13	E08	1264	Buena	<i>Exiguobacterium sp.</i>	KF560366.1	100%	0.0	99.03%
Taura	F17	E09	1248	Buena	<i>Staphylococcus xylosus</i>	KY011913.1	100%	0.0	99.32%
Taura	F18	E10	1179	Buena	<i>Staphylococcus xylosus</i>	MK414862.1	99%	0.0	90.04%

Taura	F20	E11	1151	Buena	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	MK743982.1	100%	0.0	94.77%
Taura	F25	E12	1132	Buena	<i>Bacillus pumilus</i>	MT559555.1	100%	0.0	94.53%
Taura	F26	F01	1246	Buena	<i>Providencia rettgeri</i>	LR135501.1	97%	0.0	94.90%
Taura	F27	F02	955	Baja	<i>Staphylococcus sp.</i>	GQ369025.1	98%	0.0	89.36%
El Morro	F28	F03	1253	Buena	<i>Vibrio alginolyticus</i>	MK102568.1	100%	0.0	97.74%
El Morro	F30	F04	1287	Buena	<i>Staphylococcus sp.</i>	OR553770.1	99%	0.0	98.52%
El Morro	F31	F05	1284	Buena	<i>Vibrio sp.</i>	MN510794.1	97%	0.0	96.54%
El Morro	F32	F06	1280	Buena	<i>Staphylococcus sp.</i>	OR553770.1	100%	0.0	98.96%
El Morro	F33	F07	1237	Buena	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	OQ626072.1	100%	0.0	98.85%
El Morro	F34	F08	1257	Buena	<i>Staphylococcus sp.</i>	OR553770.1	100%	0.0	98.61%
El Morro	F35	F09	1173	Baja	<i>Staphylococcus sp.</i>	EU162000.1	92%	0.0	90.23%
El Morro	F36	F10	1205	Buena	<i>Vibrio sp.</i>	MG554547.1	99%	0.0	98.53%
El Morro	F37	F11	1153	Buena	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	MH244245.1	99%	0.0	99.20%
El Morro	F38	F12	1163	Buena	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	MH091008.1	95%	0.0	96.95%
El Morro	F39	G01	1042	Buena	<i>Vibrio mediterranei</i>	MN945279.1	100%	0.0	99.71%
El Morro	F40	G02	1216	Buena	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CP051111.1	99%	0.0	99.80%

El Morro	F41	G03	1291	Buena	<i>Vibrio mediterranei</i>	MN945279.1	99%	0.0	98.63%
El Morro	F42	G04	1229	Buena	<i>Vibrio harveyi</i>	MN938186.1	99%	0.0	98.82%
El Morro	F43	G05	1226	Buena	<i>Vibrio mediterranei</i>	MN945279.1	100%	0.0	98.00%
El Morro	F45	G06	1225	Buena	<i>Vibrio mediterranei</i>	MN945279.1	100%	0.0	98.96%
El Morro	F46	G07	1223	Buena	<i>Vibrio natriegens</i>	MN938225.1	98%	0.0	94.39%
Sabana Grande	G01	G08	1232	Buena	<i>Staphylococcus xylosus</i>	OQ626043.1	99%	0.0	98.11%
Sabana Grande	G02	G09	1199	Buena	<i>Bacillus subtilis</i>	KT380826.1	100%	0.0	98.99%
Sabana Grande	G03	G10	1315	Baja	<i>Vibrio cholerae</i>	MN907465.1	50%	0.0	98.80%
Sabana Grande	G04	G11	1137	Buena	<i>Listeria grayi</i>	KY971292.1	100%	0.0	95.02%
Sabana Grande	G05	G12	1078	Buena	<i>Staphylococcus sp.</i>	MN822244.1	99%	0.0	91.11%
Sabana Grande	G06	H01	1291	Baja	<i>Staphylococcus sp.</i>	HM812785.1	75%	0.0	88.74%
Sabana Grande	G07	H02	1173	Baja	<i>Staphylococcus sp.</i>	MK617293.1	99%	0.0	94.63%
Sabana Grande	G08	H03	1213	Buena	<i>Morganella sp.</i>	KF751866.1	100%	0.0	97.80%
Sabana Grande	G09	H04	1220	Buena	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	KJ999602.1	99%	0.0	98.52%
Sabana Grande	G10	H05	1207	Buena	<i>Vibrio cholerae</i>	MW165392.1	98%	0.0	97.28%

Sabana Grande	G11	H06	1199	Buena	<i>Staphylococcus sp.</i>	OR553768. 1	100%	0.0	97.47%
Sabana Grande	G12	H07	848	Baja	<i>Staphylococcus sp.</i>	MW485187 .1	84%	0.0	94.18%
Sabana Grande	G13	H08	1176	Buena	<i>Staphylococcus sp.</i>	MG251639. 1	98%	0.0	96.84%
Sabana Grande	G14	H09	1171	Buena	<i>Staphylococcus sp.</i>	HM821825. 1	100%	0.0	98.94%
Sabana Grande	G15	H10	1159	Baja	<i>Staphylococcus sp.</i>	HM808147. 1	100%	0.0	87.02%
Sabana Grande	G16	H11	1107	Buena	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	OP028003. 1	100%	0.0	99.82%
Sabana Grande	G17	H12	1090	Buena	<i>Vibrio sp.</i>	MZ298719. 1	99%	0.0	99.44%