

IMPORTANCIA Y ESTUDIOS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN LOS RECURSOS Y PRODUCTOS PESQUEROS

Studies and importance of microbial communities in fishery resources and products

¹María Concepción de la Cruz-Leyva, ²Marcela Zamudio-Maya, ²Alma Irene Corona-Cruz, ¹José Ulises González-de la Cruz, ²Rafael Antonio Rojas-Herrera

¹Division Académica Multidisciplinaria de los Ríos, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Tenosique-Estapilla Km 1, Tenosique. Tabasco, México.

²Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Merida Yucatán
 *concepcion.delacruz@ujat.mx.

Artículo de revisión **recibido:** 10 de junio de 2010, **aceptado:** 22 de agosto de 2014

RESUMEN. Los microorganismos son parte fundamental de la vida del planeta. La flora bacteriana constituye un componente esencial de las redes tróficas en los ecosistemas marinos, tanto en actividad como en cantidad de biomasa, contribuyendo a la regeneración de nutrientes e interactuando con una amplia gama de organismos. Para comprender su función en los nichos específicos, es esencial identificar y cuantificar cada uno de los miembros que conforman estas comunidades, así como las actividades metabólicas que presentan. La detección e identificación de estos microorganismos permite inferir sobre la diversidad poblacional en la muestra analizada o el estado de salud del consumidor. Por otro lado, este conocimiento puede ofrecer, el aprovechamiento de cepas o de metabolitos microbianos en procesos biotecnológicos. Una alternativa eficiente para la investigación de comunidades bacterianas en muestras complejas ha sido el análisis del gen 16S ARNr con métodos moleculares de huellas genéticas como RAPD, TRFLP, DGGE. En este contexto, diversos autores indican que los recursos pesqueros poseen una abundante diversidad bacteriana que pueden ser aprovechadas, que si se identifica oportunamente, previene daños en el recurso pesquero y a los consumidores.

Palabras clave: Comunidades microbianas, métodos moleculares, productos pesqueros.

ABSTRACT. Microorganisms are an essential part of life in the planet. The bacterial flora is an crucial component of trophic webs in marine ecosystems, both in activity and quantity of biomass, contributing to nutrient recycling and establishing complex interactions with a wide range of organisms. To understand its role in specific niches, it is essential to identify and quantify each of the members who make up these communities, then to infer the taxonomic and genetic diversity in the analyzed sample. For food products, these analyses may bring information on possible effects on the health of the consumer or may allow the isolation of microbial strains or metabolites useful in biotechnological processes. Health of the consumer. Furthermore, this knowledge can provide, the use of strains or microbial metabolites in biotechnological processes. An efficient alternative for the investigation of bacterial communities in complex samples has been the analysis of the 16S rRNA gene by fingerprinting methods as RAPD, TRFLP and DGGE. In this context, several authors indicate that fish stocks have an abundant associated bacterial flora bearing biotechnological potential or that may help, prevents damages to the fishery resource and final consumers.

Key words: Microbial communities, molecular methods, fishery products.

INTRODUCCIÓN

Desde un enfoque ecológico los microorganismos participan en el reciclado de la materia en los ecosistemas y por tanto, controlan la evolución de la biosfera al interactuar de forma

dinámica en los ciclos biogeoquímicos (Lyautey et al. 2005), desde el punto de vista de la seguridad alimentaria algunas familias bacterianas como *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* incluyen especies que son las responsables de infecciones e intoxicaciones de los consumidores, que pueden originar

hasta la pérdida de vidas humanas.

Se estima que tan solo se conoce alrededor del 0.1 al 10 % de las bacterias del medioambiente (Torsvik *et al.* 2002), debido principalmente a que la mayor parte de los microorganismos no pueden ser aislados e identificados con los métodos de cultivo tradicionales (Barer y Harwood 1999, Crosi *et al.* 2007), por lo que, los datos obtenidos mediante la aplicación de estas metodologías subestiman la diversidad y riqueza de especies de la comunidad microbiana presente en la muestra. Por ejemplo, las cepas en estado de dormancia o en estado viable pero no cultivable no son detectadas (Alam *et al.* 2006).

Los métodos de detección de huellas genéticas basadas en el estudio del material genético (ADN ó ARN), permiten conocer un perfil representativo de la estructura poblacional en una comunidad bacteriana asociada a determinado hábitat, detectando a las poblaciones sean o no cultivables (Muyzer *et al.* 1993, Huber *et al.* 2004). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en combinación con otras metodologías han permitido el estudio de la composición de comunidades bacterianas en muestras de sedimentos marinos (Muyzer *et al.* 1993), estuarinos (Henriques *et al.* 2006), biopelículas en sistemas acuáticos (Lyautey *et al.* 2005), asociadas a organismos acuáticos (McIntosh *et al.* 2008, Yang *et al.* 2007) y diversos productos alimentarios. A pesar de los avances que se tienen es necesario extrapolar este tipo de investigaciones a los productos pesqueros, ya que la detección e identificación de la flora bacteriana presente, así como el estado metabólico en el que se encuentran ofrece la posibilidad de tomar decisiones oportunas sobre el tratamiento, manejo y disponibilidad de alimentos de origen marino para un mejor aprovechamiento.

Los productos pesqueros son una fuente importante de proteínas y otros componentes nutritivos en la alimentación humana. Entre estos productos se clasifican peces y mariscos; en estos últimos se agrupan camarones, ostras, ostiones, almejas, calamares, pulpos, entre otros. Debido a su composición química y hábitat los recursos pesqueros poseen una abundante diversidad microbiana que puede interactuar de forma positiva, como con-

trol biológico de enfermedades para el propio animal (Aly *et al.* 2008); negativas, cuando causa enfermedad, muerte o contaminación de los recursos pesqueros en las etapas larval, adulta y reproductiva (Goldschmidt-Clermont *et al.* 2008). Al igual que deterioro del producto y transmisión de enfermedades a los consumidores. En la presente revisión se pretende analizar la importancia del estudio de las comunidades microbianas asociadas a recursos y productos pesqueros, así como las metodologías independientes de cultivo que actualmente se utilizan para estos fines.

LAS COMUNIDADES MICROBIANAS Y LA IMPORTANCIA DE SU ESTUDIO

Cuando se desea analizar a una especie o grupo biológico, es importante conocer el contexto ambiental y biológico en el que se encuentra; esto último se refiere a las especies con las que coexiste y en muchos casos de las que depende (hospedero). El conjunto de especies que coexisten en un lugar y tiempo constituye la comunidad o consorcio (Begon *et al.* 2006). En un sistema microbiano el crecimiento celular forma poblaciones; las poblaciones metabólicamente relacionadas se denominan gremios y el conjunto de estas agrupaciones interactúan formando comunidades microbianas. Por lo tanto, las comunidades microbianas consisten en poblaciones de células de varias especies; que interactúan entre sí desarrollando múltiples actividades funcionales al interior de la comunidad y con su hospedero (Díaz y Wachter 2003).

En el enfoque ecológico, la mayoría de las comunidades bacterianas sufren perturbaciones intermitentes como escasez de alimento, sequía, congelamiento-descongelamiento, exposición a altas concentraciones salinas y otras alteraciones causadas por las variaciones naturales del entorno o por la actividad humana. Estos factores ambientales estresantes y los metabolitos que liberan los microorganismos para enfrentarlas (enzimas, exopolisacáridos, aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, antimicrobianos, entre otros), crean oportunidades para que nuevas especies se establezcan dentro de la comunidad. Cabe citar que una perturbación fuerte

puede causar la desintegración del microhábitat y la disrupción de los límites entre poblaciones, lo que permitirá que los recursos locales estén disponibles para una mayor proporción de la masa microbiana total, es decir, más individuos pero menos especies (Torsvik y Ovreas 2002). A pesar de estos antecedentes, aún se tiene poca información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana (Zengler et al. 2002).

La integración de una comunidad microbiana funcional se regula mediante señales químicas denominadas autoinductores, usadas como comunicación de célula a célula con sus vecinos en el hábitat (Kaeberlein et al. 2002). La N-acil-homoserina lactona (AHL) es uno de los autoinductores más estudiados en bacterias Gram-negativas, liberada como una señal de censado (*Enterobacteriaceae*), que permite coordinar diferentes funciones (Dong et al. 2002; Joost et al. 2007) de conveniencia (simbiosis), competencia (antagonismo), activación o represión de genes específicos, los cuales pueden participar en la determinación de la densidad poblacional, debido a la competencia por un nicho ecológico o sustrato (Joost et al. 2007), formación de biopelículas (Lyautey et al. 2005), síntesis de compuestos inhibitorios como los antibióticos, actividad como agentes de biocontrol y otras funciones biológicas como la producción de factores patogénicos con su hospedero (Wiklund et al. 2000, Huber et al. 2004).

En términos de ecología microbiana, la abundancia y distribución de las especies, pueden ser usados para describir la estructura de la comunidad; existen índices como el índice de Shannon-Weaver y el de Simpson, entre otros para calcular la diversidad, modelos biológicos y teóricos para explicar la distribución del número de especies en clases de abundancias. La utilización de estas medidas se hace dentro de un contexto funcional, es decir, la diversidad o el reparto de los individuos entre las especies es consecuencia de interacciones ecológicas entre ellas, de las relaciones entre éstas y su medioambiente (Magurran 2004).

El estudio de las comunidades bacterianas presentes en el medioambiente tiene una enorme

relevancia en cuanto al conocimiento de la diversidad biológica global y de los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en el planeta (López y Zaballos 2005), como es el caso de las bacterias sulfato reductoras *Desulfotalea/Desulforhopalus*, *Desulfobaba*, *Desulfosarcina* y *Desulfobacter* (Purdy et al. 2003).

Los microorganismos son capaces de utilizar nutrientes y diversos elementos que otros organismos superiores no pueden explotar. Mediante el reciclado de estos elementos (Lyautey et al. 2005) regulan la disponibilidad de nutrimentos en los ambientes acuífero y marino, que pueden ser utilizados por los peces y mariscos (Purdy et al. 2003) y, en el terrestre, predomina la fertilidad del suelo y el desarrollo de las plantas que sustentan el reino animal, por lo que constituyen la base de la cadena alimentaria en la que los compuestos elementales se movilizan en la biosfera (Guerrero y Berlanga 2005). El análisis de las comunidades bacterianas permite inferir sobre las funciones positivas y negativas de los gremios o poblaciones que la conforman (Huber et al. 2004, Domínguez et al. 2006, Aly et al. 2008), permitiendo el aprovechamiento de consorcios, cepas y metabolitos bacterianos con actividades funcionales aprovechables por el hombre. En los últimos años en la acuicultura de camarones *Litopenaeus vannamei* y peces se han aprovechando los consorcios microbianos como fuente de alimento, así como en el mejoramiento del ambiente en el cultivo (Becerra-Dórame et al. 2011, 2014).

Recientemente el estudio de las comunidades microbianas, su diversidad y estatus metabólico era difícil, debido a que la mayoría de los microorganismos no son cultivados mediante el uso de las técnicas tradicionales de la microbiología. Esto obedece a diversas razones, condiciones ambientales, requerimientos nutricionales, desconocimiento de la fisiología del microorganismo de interés y fundamentalmente, a causa del amplio desconocimiento de las interacciones que tienen lugar en la comunidad microbiana. En la actualidad la aplicación de técnicas moleculares, permiten el análisis de las secuencias de genes específicos e incluso de genomas completos, permitiendo grandes avances en el estudio

de los microorganismos en poco tiempo (Giraffa y Neviani 2001, Torsvik y Ovreas 2002, Croci et al. 2007).

ESTUDIO MOLECULAR DE COMUNIDADES BACTERIANAS

La incapacidad de cultivar las bacterias presentes en un hábitat determinado, ha sido parcialmente suplida por la posibilidad de aislar y caracterizar el material genético de la comunidad microbiana residente en dicho medio. A partir del estudio de los genomas de los microorganismos contenidos en la muestra, es posible reconstruir la estructura poblacional de la comunidad (Yang et al. 2007). Al conjunto de los genomas de los microorganismos de una muestra o hábitat determinado se le llama metagenoma (Handelsman et al. 1998, Handelsman 2004). Este tipo de investigación parte del análisis de los ácidos nucleicos e incluye a aquellos microorganismos que aún no han podido ser cultivados en condiciones simuladas (Villadas et al. 2002, Alam et al. 2006, de la Cruz-Leyva et al. 2011).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por K. Mullis en la década de los 80 (Mullis et al. 1987, Mullis 1990, Saiki et al. 1985, Saiki et al. 1988), es la metodología empleada para la amplificación selectiva de secuencias de ácidos nucleicos. Mediante esta técnica es posible realizar sucesivas amplificaciones a partir de pequeñas cantidades de ADN. Además, por medio de la transcripción inversa y posterior PCR (RT-PCR) se lleva a cabo la conversión del ARN a ADN complementario (ADNc) y la amplificación, ofreciendo así la posibilidad de realizar análisis en el ADN y ARN asociados a diversas muestras complejas para poder hacer inferencias sobre la composición poblacional y el estatus metabólico de la comunidad (Kim et al. 2007), mediante el análisis de las secuencias de los genes amplificados con iniciadores específicos o universales.

Por medio del análisis de secuencias de genes ortólogos, es posible medir la distancia evolutiva entre organismos e inferir las relaciones filogenético-evolutivas, que constituyen la base natural para clasificarlos (Díaz y Wachter 2003). Para comparar

secuencias es necesario alinear las moléculas, por lo que deben contener regiones con similitud significativa, además de las que difieren en sus secuencias y éstas deben cambiar a una velocidad proporcional a la distancia evolutiva (Walter et al. 2000, Case et al. 2007). Los genes elegidos deben estar universalmente distribuidos en el grupo que se desea estudiar y deben ser funcionalmente homólogos en cada organismo.

La descripción de los microorganismos existentes en muestras ambientales presentan avances, gracias a la utilización de la información que proporcionan los genes que codifican el ARN ribosomal, en particular el gen que codifica la subunidad menor del ribosoma bacteriano, 16S ARNr. Esta molécula está presente en todos los organismos y en todos desempeña la misma función. Si bien tiene limitaciones, dado que diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en secuencia entre los diferentes taxa, permite realizar comparaciones con varios niveles de resolución. El análisis de la secuencia de estos genes permite realizar reconstrucciones filogenéticas entre los microorganismos, lo que ha llevado a la reestructuración de la taxonomía moderna (Cole et al. 2005; Woese et al. 1990; Woese 1998). La amplificación de regiones específicas del gen 16S ARNr su posterior secuenciación y comparación de éstas con otras de referencia, permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre organismos procariontes y la identificación de las bacterias. Con este propósito frecuentemente se recurre a bases de datos como la GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y la Ribosomal Database Project (RDP) de la Universidad Estatal de Michigan (Cole et al. 2009); en esta última hay depositadas 2 929 433 secuencias disponibles del gen 16S ARNr de los dominios bacterias y Arqueales, y 95 365 secuencias del gen 28S ARNr de hongos hasta 14 de julio de 2014.

Para obtener mayor conocimiento de la diversidad y estructura de las comunidades microbianas en distintos ambientes, se han adaptado algunas herramientas moleculares, para ser utilizadas con fines taxonómicos (González-de la Cruz et al. 2011). En la última década se ha extendido el uso de éstas

técnicas, también usando genes funcionales como marcadores moleculares, para poder relacionar la estructura y función de las comunidades microbianas (Muyzer y Smalla *et al.* 1998). El perfil de la diversidad genética bacteriana en la comunidad puede ser analizado mediante métodos de huellas génicas como los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), TGGE (Temperature Gradient Electrophoresis Gel) y DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Welsh y McClelland 1990, Muyzer *et al.* 1993, Liu *et al.* 1997, Osborn *et al.* 2000, Walter *et al.* 2000, Martin-Laurent *et al.* 2001). Este último, es un método ampliamente utilizado para la obtención de huellas genéticas en distintos tipos de muestra ambientales y comunidades microbianas complejas (Díaz y Wacher 2003, González-de la Cruz *et al.* 2011).

La técnica de DGGE se ha utilizado para detectar diferencias en el comportamiento de pequeños fragmentos (200-700 pb) de genes obtenidos mediante PCR (amplicones). Los oligonucleótidos que se utilizan en el análisis, deben contener en el extremo 5 una secuencia rica en GC de unas 40 bases, denominada grapa GC (GC-clamp), cuya función es impedir la desnaturalización completa y la aparición de hebras de ADN de cadena sencilla. A través de la desnaturalización progresiva del ADN o ADNc amplificado se obtiene un patrón de bandas que permite identificar y cuantificar la diversidad genética presente en la flora microbiana (Muyzer *et al.* 1993). La intensidad de las bandas indica la abundancia relativa de poblaciones específicas en la comunidad de interés; es importante tener presente que en ocasiones esta intensidad puede deberse a numerosas copias de una misma secuencia en el mismo organismo, o a que existen muchas células del organismo que poseen la secuencia. Por lo anterior, es importante la pericia en la detección y ajuste del contorno de la banda y los fundamentos de ecología poblacional del investigador que genera y describe estos resultados (Escalante 2007). Una forma de distinguir entre estas dos posibilidades, es mediante la técnica de hibridación *in situ*. Otra alternativa es correr en el mismo gel los productos

de la PCR de ARNr y ADNr para comparar la intensidad de las bandas y con éstos, determinar si éstas se encuentran relacionadas con el número de copias del gen.

ÍNDICES DE DIVERSIDAD EN COMUNIDADES BACTERIANAS

Biodiversidad es la riqueza de organismos vivos de un ecosistema, así como los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la variación dentro de cada especie, entre las especies y los ecosistemas (Moreno 2001). El conocimiento de la biodiversidad requiere considerar los diferentes niveles jerárquicos de organización de la vida (genes, especies, poblaciones, comunidades y ecosistemas), junto con sus atributos de composición, estructura y funcionalidad. Su estudio puede abordarse a partir de tres grandes preguntas en cada uno de los niveles: ¿qué elementos la componen?, ¿cómo están organizados? y ¿cómo interactúan? (Noss 1990).

En estudios de biodiversidad se debe especificar la escala geográfica, definir si es local o regional, para asociarla a las medidas de la diversidad alfa (α), beta (β) y gamma (γ). El número de especies o diversidad α está referida a un nivel local y refleja la coexistencia de las especies en una comunidad. La diversidad α es la riqueza de especies de una comunidad determinada y que se considera homogénea. La diversidad β es la medida del grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades en una región; refleja la respuesta de los organismos a la heterogeneidad espacial (Halffter *et al.* 2001, Moreno 2001, Villarreal *et al.* 2006). La diversidad γ es la riqueza total de especies en una región en la cual se incluyen varias comunidades o el recambio existente entre regiones; refleja fundamentalmente los procesos evolutivos que han actuado en un nivel geográfico mayor (Halffter *et al.* 2001). La caracterización de las especies provee una medida de la variedad de formas de vida, además aporta información de diferentes facetas de esa variedad, como diversidad funcional, diversidad a diferentes niveles taxonómicos y heterogeneidad espacial (Gaston 1996).

Los principales parámetros utilizados para es-

timar la diversidad en comunidades microbianas son riqueza de especie, índice de Shannon-Weaver, índice de Simpson y equidad; la riqueza de especies (R), se define como el número de diferentes organismos presentes en una muestra (Magurran 2004), sin tomar en cuenta el valor de importancia de las mismas (Moreno 2001). Shannon-Weaver asume que todas las especies están representadas en las muestras; indica qué tan uniformes están representadas las especies teniendo en cuenta todas las especies muestreadas (Shannon y Weaver 1963). El índice de Simpson (D) mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar en un hábitat pertenezcan a la misma especie. En este índice mientras mayor sea su valor mayor será la diversidad de la comunidad, ya que este valor depende tanto de la riqueza de especies, como de la regularidad o equidad con que los individuos están distribuidos entre las especies. Una comunidad rica en especies, pero con una distribución irregular de individuos, tendrá un índice más bajo que otra comunidad con una riqueza menor pero con los individuos bien distribuidos. Por lo tanto, cuando calculemos la diversidad para dos comunidades, aquella que genere un valor de D más alto y más cercano a la riqueza (R) será la más diversa. La equidad u homogeneidad, es la medida de la abundancia de cada especie y qué tan uniformemente se encuentran distribuidas (Magurran 2004).

En ecología microbiana, se ha investigado la diversidad bacteriana en diferentes ambientes acuáticos comparando patrones de bandeo con técnicas de huellas digitales (T-RFLP, RFLP, DGGE), para estimar la riqueza y composición de la comunidad, aplicando parámetros de diversidad (Boon et al. 2002; Cho y Kim 2000, Villanueva et al. 2007). Danovaro et al. (2006) indican que la diversidad bacteriana en diferentes ambientes acuáticos comparando dos técnicas de huellas genéticas (T-RFLP y ARISA), estimando la riqueza y composición de la comunidad bacteriana. Los índices de riqueza estimados mediante el método de T-RFLP oscilaron entre 27 y 99 filotipos, mientras que utilizando ARISA la riqueza se estimó entre 62 y 101 genotipos. Aunque las dos técnicas proporcionaron resultados similares en el análisis de la estructura

de la comunidad, la riqueza de la diversidad bacteriana y las estimaciones fueron significativamente superiores utilizando ARISA. La Valley et al. (2009) evaluaron perfiles de bandeo de DGGE asociados a la comunidad bacteriana del ostión japonés *Crasostrea virginica*, analizada mediante estrategias dependiente e independiente (ADN total) de cultivo, utilizando índice de Shannon, el índice de similitud y análisis de agrupamiento de patrones de bandas en gel. Mediante un análisis de clúster se demostró que habían diferencias en los patrones de bandeo y los índices de diversidad estimados, obtenidos mediante ambas estrategias. También se detectaron diferencias significativas en los perfiles de la comunidad asociada a los ostiones y la del agua de mar.

Por lo anterior, las técnicas moleculares de huellas genéticas ofrecen una alternativa para el análisis de los cambios en la estructura de la comunidad microbiana, especialmente cuando se trata de un gran número de muestras (Ramette 2009).

COMUNIDADES MICROBIANAS

Aplicando metodologías de huellas genéticas, se estudió la composición y dinámica de comunidades microbianas entre la columna de agua y el sistema de cría larval de la langosta *Panulirus ornatus* (Payne et al. 2006). Por otro lado, Hagi et al. (2004) utilizando el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) estudiaron la diversidad de bacterias ácido lácticas (BAL) del tracto intestinal de peces de agua dulce (*Cyprinus carpio*, *Ictalurus punctatus*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Carassius cuvieri*) a través de cambios estacionales; entre todas las BAL, la especie predominante en verano fue *Lactococcus lactis* y *L. raffinolactis* en invierno independientemente de la especie del pez analizado.

Utilizando perfiles PCR-DGGE se detectó la variación en la estructura de la comunidad bacteriana de los peces *Pangasius hypophthalmus* cosechados en granja, en diferentes época del año (Le Nguyen et al. 2008). Otras investigaciones relacionadas con el estudio de comunidades bacterianas en recursos pesqueros, han caracterizado mediante DGGE la microbiota intestinal del salmón del atlántico *Salmon salasar* identificando *Lactobacillus* sp,

Lactococcus sp, *Bacillus* sp, *Photobacterium phosphoreum*, *Acinetobacter* sp, *Pseudomonas* sp y *Vibrio* sp (Hovda et al. 2007a). En un estudio de la población bacteriana del bacalao *Gadus morhua* (huevo y larva), se detectaron *Arcobacter* sp, *Vibrio* sp, *Alteromonas* sp y *Pseudoalteromonas* sp, *Colwellia* sp, *Vibrio logei*, *V. fischeri* (reclasificado como *Aliivibrio logei*, *A. fischeri* respectivamente (Urbanczyk et al. 2007)), *Listonella anguillarum*, *Flexibacter aurantiacus* y *Mycoplasm*a sp (McIntosh et al. 2008).

Mientras que Huber et al. (2004), identificaron la microbiota dominante cultivable y no cultivable en el intestino de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, utilizando una metodología polifásica que incluyó DGGE. La estructura poblacional bacteriana fue identificada en su mayoría como γ -proteobacteria (principalmente *Aeromonas* y de la familia Enterobacteriaceae), también se detectaron *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, β -proteobacteria y bacterias Gram-positivas. Otra investigación sustentan la dominancia de las γ -proteobacterias en la microflora intestinal de los peces (Kim et al. 2007).

La importancia de él estudio de comunidades bacterianas en los recursos pesqueros, se debe a que se ha generado un considerable interés en el uso de bacterias probióticas para incrementar la resistencia a enfermedades, mediante la estimulación del sistema inmunológico en el cultivo de peces (Aly et al. 2008, Aguirre-Gúzman et al. 2012, Dad et al. 2014) y mariscos. En el camarón *Marsupenaeus japonicus* se ha indicado el papel inmunomodulador de *Lactobacillus lactis* (Maeda et al. 2014) y en *L. vannamei* se observó el efecto de la suplementación de la dieta con *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y la respuesta inmune (Shen et al. 2010).

Dentro del grupo de bacterias con funciones biológicas positivas en la acuicultura, se citan bacterias ácido lácticas (Michel et al. 2007, Maeda et al. 2014) *L. plantarum*, *L. helveticus* y *Streptococcus thermophilus* (Gatesoupe 1991), *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. circulans* (Ochoa-Solano y Olmos-Soto 2006; Bairagi et al. 2004, Kumar et al. 2006), *B. pumilus*, *B. firmus*, y algunas Gram-negativas como *Citrobacter freundii* (Aly et al. 2008), *V. al-*

ginolyticus (Rodríguez et al. 2007) y otras Gram-positivas *Carnobacterium inhibens* (Irianto y Austi 2002). La especie *B. subtilis* es ampliamente utilizada como probiótico; por ejemplo, Ghosh et al. (2007) estudiaron la suplementación para observar el efecto probiótico sobre la transformación reproductiva, en cuatro especies de peces ornamentales (*Poecilia reticulata*, *P. sphenops*, *Xiphophorus helleri* y *X. maculatus*), comprobando un incremento significativo en el índice gonadosomático, fecundidad y producción de alevines. Günther y Jiménez-Montealegre (2004), revelaron el efecto positivo de la suplementación de *B. subtilis* en la dieta, sobre el crecimiento de la tilapia *Oreochromis niloticus* y el langostino *Macrobrachium rosenbergii*. Por otro lado, la bacteria *Aeromonas media* produce sustancias extracelulares que han mostrado actividad inhibitoria sobre *Saprolegnia parasitidica* (Lategan et al. 2004). Se han usado antígenos de *V. anguillarum* (bacteria patógena) en *Paralichthys olivaceus*, obteniendo una respuesta inmune efectiva (Li et al. 2005); otros investigadores han aprovechado la immunoestimulación larval y juvenil de algunos organismos acuáticos, utilizando lipopolisacáridos aislados de algunas bacterias como *Aeromonas salmonicida* (Magnadottir et al. 2006).

Con lo anterior se confirma que algunas de las especies bacterianas, aisladas de muestras ambientales y recursos pesqueros exhiben efectos funcionales positivos. A nivel mundial, el sector pesquero frecuentemente registra pérdidas económicas causadas por enfermedades bacterianas patógenas que infectan peces y mariscos en su hábitat y en cautiverio (Michel et al. 2007, Panangala et al. 2007) (Tabla 1).

Se debe tener presente que hay recursos pesqueros que poseen en su flora bacteriana cepas ubicuas del género *Vibrio* que son registrados como patógenos, pero para ellos es parte de su flora natural y no les afecta negativamente. También existen especies causantes de enfermedades infecciosas en organismos vivos y agentes contaminantes de alimentos y aguas, que pueden ser transmitidas a los seres humanos mediante el consumo de productos pesqueros contaminados por *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, entre otros produciendo

Tabla 1. Bacterias patógenas detectadas y estudiadas mediante métodos moleculares en recursos pesqueros.

Table 1. Pathogenic bacteria have been detected and studied using molecular methods in fishery resources.

Muestra	Patógeno	Método de detección	Referencia
Peces marinos (diferentes especies) de los Estados Unidos de América, Europa y Japón.	<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>damsela</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>Listonella anguillarum</i> .	PCR- multiplex	González et al. 2004.
Trucha arco iris, alevines y carpa común cultivados.	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. bestiarum</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. jandaei</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. veronii</i> .	PCR-RFLP	Kozińska, 2007.
Peces <i>Perca fluviatili</i> .	<i>Yersinia ruckeri</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. media</i> , <i>V. anguillarum</i> .	PCR	Goldschmidt-Clermont et al. 2008.
Rotíferos <i>Brachionus plicatilis</i> .	<i>L. anguillarum</i> , <i>V. splendidus</i> .	Real-time PCR, DGGE	Prol-García et al. 2010.
Trucha <i>Oncorhynchus mykiss</i> . Tilapia, <i>C. carassius</i> , <i>P. innesi</i> .	<i>Lactococcus raffinolactis</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>Streptococcus iniae</i> .	ARDRA	Michel et al. 2007.
Trucha <i>O. mykiss</i> .	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> .	PCR	Urdaci et al. 1998.
Trucha <i>O. mykiss</i> .	<i>F. psychrophilum</i> .	Nested-PCR	Wiklund et al. 2000.
Trucha.	<i>F. psychrophilum</i> .	PCR	Crumlish et al. 2007.
Peces marinos.	<i>Flexibacter maritimus</i> .	Nested-PCR	Cepeda et al. 2003.
Ostras.	<i>V. parahaemolyticus</i> .	Sondas de ADN	DePaola et al. 2003.
Ostras.	<i>V. parahaemolyticus</i> .	PCR	Deepanjali et al. 2005.
Ostras.	<i>V. vulnificus</i> .	TR-PCR	Panicker et al. 2004.
Ostras.	<i>V. vulnificus</i> .	TR-PCR /TaqMan	Panicker y Bej 2005.
Ostras <i>C. virginica</i> .	<i>V. vulnificus</i> .	PCR	Warner y Oliver 2008.
Ostión.	<i>V. colera</i> 01.	PCR	Koch et al. 1994.
Almeja.	<i>V. tapetis</i> .	SSP-PCR	Paillard et al. 2006.
Camarón <i>Penaeus monodon</i> .	<i>V. parahaemolyticus</i> .	PCR	Sujeewa et al. 2009.
Peces cultivados. Infectados.	<i>F. columnare</i> .	RT-PCR/TaqMan	Panangala et al. 2007.
Pescado y mariscos tropicales.	<i>V. parahaemolyticus</i> .	PCR	Dileep et al. 2003.

trastornos gastrointestinales (Delgado et al. 2003, Gatti et al. 2014). Además algunos serotipos son resistentes a los antibióticos como los de la *Salmonella* (Amagliani et al. 2012) y *Listeria monocytogenes* (Fallah et al. 2013).

COMUNIDADES BACTERIANAS EN PRODUCTOS PESQUEROS

Desde el punto de vista de la seguridad alimenticia existe una amplia preocupación por las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), fundamentalmente por la ingestión de pescados y

mariscos contaminados con bacterias patógenas (SIRVETA 2004) como por ejemplo *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp, *E. coli*, *S. aureus*, en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (NOM-242-SSA1-2009, Zarei et al. 2012). En muestras de pulpo procedentes de congeladoras de Yucatán, México, se han aislado bacterias patógenas como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* 0157:H7 (Zamudio-Maya et al. 2002). También se ha detectado la prevalencia de bacterias del *Phylum* Proteobacteria (*Vibrio* sp, *Photobacterium* sp), Bacteroidetes y Fusobacteria en este producto pesquero (de la Cruz-Leyva et al. 2011) (Tabla 2).

Tabla 2. Especificaciones microbiológicas de los productos pesqueros frescos y refrigerados.

Table 2. Microbiological specifications of fresh and chilled fish products.

Patógeno	Grupo pesquero	Límite permisible (NOM-242-SSA1-2009)
Coliformes fecales y/o <i>E. coli</i>	Pescados y crustáceos	400 NMP/g
	Moluscos y bivalvos	230 NMP/100 g de carne
	Moluscos cefalópodos y gasterópodos	230 NMP/100 g de carne
<i>Vibrio cholerae</i> 0:1 y no 0:1	Moluscos y bivalvos	Ausente en 50 g
	Demás productos de la pesca	Ausente en 50 g
<i>Salmonella</i> sp	Todas	Ausente en 25 g
<i>V. parahaemolyticus</i>	Moluscos, bivalvos y crustáceos	10 ⁴ NMP/g
<i>V. vulnificus</i>	Moluscos y bivalvos	Ausente en 50 g
<i>L. monocytogenes</i>	Todas	Ausente en 25 g
<i>S. aureus</i>	Todas	1 000 UFC/g

En este contexto *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* 0:1 y no 0:1 y *V. vulnificus* son las principales especies del género *Vibrio* ligadas a infecciones provocadas por la ingestión de productos pesqueros (Bauer et al. 2006, DePaola et al. 2003, Ward y Bej 2006).

Durante 1999-2000, en Estados Unidos de América se registraron brotes relacionados con el consumo de mariscos crudos contaminados con *V. parahaemolyticus*, esta bacteria produce diarreas coleriformes autolimitadas (DePaola et al. 2003, Ward y Bej 2006). En el período 2000-2002, *Salmonella* sp fue el primer agente causal de infecciones alimentarias en América Latina, con un 13.39 % de los casos a causa del consumo de pescados y mariscos; durante este mismo período en México ocurrieron seis brotes de salmonelosis donde también estuvo involucrada la ingestión de productos pesqueros (SIRVETA 2004).

En la comercialización e industrialización de los pescados y mariscos, algunas especies bacterianas constituyen agentes que pueden causar olores y sabores extraños, formación de exudados, producción de gases, pérdida de color y cambios de textura (Huss 1997), causando el deterioro de los productos y por consiguiente, pérdidas económicas.

Se han hecho extensivas investigaciones enfocadas al estudio de comunidades bacterianas en diversos productos pesqueros con potencial económico, a partir de técnicas moleculares de huellas genéticas. Reynisson et al. (2009) es-

tudieron la sucesión de la composición bacteriana en lomos de bacalao *Gadus morhua* durante el almacenamiento a bajas temperaturas y en atmósfera modificada, utilizando T-RFLP, encontrando que la abundancia relativa de *Photobacterium phosphoreum* aumentó con el tiempo de almacenamiento; otras especies existentes fueron *Pseudomonas* sp, el género *Shewanella*, *Acinetobacter* sp, *Psychrobacter* sp, *V. logei*, *Moritella* sp, y *Pseudoalteromonas* sp. En los productos empaquetados la microflora estuvo dominada por *Sphingomonas* sp y *P. fluorescens*, y en menor proporción *Variovorax* sp y *Bradyrhizobium* sp. Hovda et al. (2007a) detectaron por PCR-DGGE la presencia de *P. phosphoreum*, *Pseudomonas* sp, *Shewanella baltica* y *S. putrefaciens* en bacalao *G. morhua* empaquetado con ozono en condiciones controladas, no encontrando diferencias significativas en la microflora comparada con los controles. En otro estudio similar, donde se caracterizó la población bacteriana dominante en halibut *hippoglossus* de cultivo, envasado en atmósfera modificada de CO₂:N₂ y CO₂:O₂ se identificó *Brochothrix thermosphact*, además de las especies bacterianas anteriores a excepción de *S. baltica* (Hovda et al. 2007b).

Adicionalmente, en los productos derivados de la pesca se han utilizado los métodos de huellas genéticas para revelar la autenticidad de origen de los productos pesqueros (Bossier 1999, Le Nguyen et al. 2008). En este sentido, Le Nguyen et al. (2008) indican que los perfiles de bandeo generados

por PCR-DGGE son una herramienta de trazabilidad, debido a que una manera de rastrear el origen de un producto puede ser mediante el análisis global de las comunidades bacterianas de las muestras de alimentos después de su exportación.

CONCLUSIONES

El sector pesquero es una de las actividades económicas con mayor potencial de crecimiento en la producción de alimentos de origen animal. Sin embargo, en los sistemas de cultivo intensivo de peces y mariscos, así como en la comercialización e industrialización de los productos pesqueros frecuentemente son causa de infecciones e intoxicaciones alimentarias en los seres humanos; debido a enfermedades bacterianas causadas por especies patógenas al organismo o desequilibrio en su flora de acompañamiento, lo cual origina pérdidas económicas. En este sentido es importante citar que el estudio de la biodiversidad de un determinado ecosistema, como el de los mantos acuíferos estaría incompleto sin la inclusión de los microorganismos, ya que ellos contribuyen de manera esencial al funcionamiento global del planeta y al desarrollo sostenible de la biosfera. Para comprender su función en sus nichos específicos, es esencial identificar y cuantificar cada uno de los miembros que conforman la comunidad. Con la aplicación de técnicas moleculares de huellas de ADN, se ha logrado progresar en el conocimiento de la diversidad bacteriana presente en una comunidad ambiental y ecosistemas alimentarios, tales como los recursos

y productos pesqueros. Estudios recientes mencionan que con los métodos de cultivo tradicional, los resultados obtenidos sobre comunidades microbianas complejas muestran sesgos importantes, causados por la imposibilidad de cultivar la mayoría de las especies microbianas. Sin embargo, mediante métodos moleculares independientes de cultivo es posible caracterizar la diversidad aún no cultivable, presente en diferentes muestras ambientales. La información generada mediante la combinación de las estrategias de la microbiología tradicional y los métodos moleculares permiten detectar la función de las comunidades bacterianas en distintos hábitad, identificar bacterias funcionales aprovechadas en la biotecnología y contribuir en el estudio de la calidad de los productos alimenticios. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es de alta importancia detectar la flora bacteriana acompañante de pescados y mariscos con el fin de conocer las bacterias que puedan provocar decremento en la calidad del producto e identificar bacterias patógenas que han sido identificadas como responsables de numerosas enfermedades gastrointestinales.

AGRADECIMIENTOS

MCCL y JUGC agradecen a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por su apoyo para la participación en el programa de fortalecimiento académico 2007-2010 y al CONACYT por las becas: 164190/164190 y 202232.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Guzmán G, Lara-Flores M, Sánchez-Martínez JG, Campa-Córdova AI, Luna-González A (2012) The use of probiotics in aquatic organisms: A review. *African Journal of Microbiology Research* 23: 4845-4857.
- Alam M, Sultana M, Balakrish NG, Bradley SR, Sack DA, Siddique AK, Ali A, Huq A, Colwell RR (2006) Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2849-2855.
- Aly SM, Abd-El-Rahman AM, John G, Mohamed MF (2008) Characterization of some bacterial isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture* 277: 1-6.
- Amagliani G, Brandi G, Schiavano GF (2012) Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Research International* 45: 780-788.

- Bairagi A, Sarkar K, Sen SK, Ray AK (2004) Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita*(Hamilton). *Aquaculture Research* 35: 436-446.
- Barer MR, Harwood CR (1999) Bacterial viability and culturability. *Advances in microbial physiology* 41: 93-137.
- Bauer A, Østensvik Ø, Florvåg M, Ørmen Ø, Rørvik LM, (2006). *Occurrence of Vibrio parahaemolyticus, V. cholerae and V. vulnificus in norwegian blue mussels Mytilus edulis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3058-3061.
- Becerra-Dórame MJ, Martínez-Cordova LR, Martínez-Porchas M, Lopez-Elías JA, (2011) Evaluation of autotrophic and heterotrophic microcosm-based systems on the production response of *Litopenaeus vannamei* intensively nursed without artemia and with zero water exchange. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamedgeh* 63: 1-7.
- Becerra-Dórame M de J, Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M, Hernández-López J, López-Elías JA, Mendoza-Cano F (2014) Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. *Aquaculture Research* 45: 944-948.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) *Ecology. From individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing. Oxford. Reino Unido. 759 p.
- Boon N, De Windt W, Verstraete W, Top EM (2002) Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rDNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* 39: 101-112.
- Bossier P (1999) Authentication of seafood products by DNA patterns. *Journal of Food Science* 64: 189-193.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle W, Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 278-288.
- Cepeda C, García-Márquez S, Santos Y (2003) Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases* 26: 65-70.
- Cho J-C, Kim S-J (2000) Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 956-965.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM, Tiedje JM (2005) The ribosomal database project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 33: 294-296.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM (2009) The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37: 141-145.
- Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L, Ottaviani D, Pruzzo C, Serratore P, Fischetti R, Goffredo E, Loffredo G, Mioni R (2007) Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 102: 229-237.
- Crumlish M, Diab AM, George S, Ferguson HW (2007) Detection of the bacterium *Flavobacterium psychrophilum* from a natural infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), using formalin-fixed, wax-embedded fish tissues. *Journal of Fish Diseases* 30: 37-41.

- Dad TA, Bodrul MM, Mary A, Hashim R (2014) Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture* 426-427: 14-20.
- Danovaro R, Luna GM, Dell'Anno A, Pietrangeli B (2006) Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5982-5989.
- Deepanjali A, Kumar HS, Karunasagar I, Karunasagar I (2005) Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3575-3580.
- De la Cruz-Leyva MC, Zamudio-Maya M, Corona-Cruz AI, González-de la Cruz JU, Rojas-Herrera RA, (2011) A method for isolating RNA from metabolically active bacterial flora associated with octopus. *Letters in Applied Microbiology* 53: 8-13.
- Delgado R, Gutiérrez CCJ, Hurtado Á (2003) Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) de origen marino en Nueva Esparta II. Características clínicas y etiológicas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 34: 11-16.
- DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW (2003) Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1521-1526.
- Díaz RG, Wachter RC (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45: 30-40.
- Dileep V, Kumar HS, Kumar Y, Nishibuchi M, Karunasagar I, Karunasagar I (2003) Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. *Letters in Applied Microbiology* 36: 423-427.
- Domínguez ML, Garibay OC, Poggi-Varaldo HM, García MJ (2006) Caracterización de la diversidad de comunidades microbianas útiles en biorremediación y producción de probióticos por su huella genética. *Revista Latinoamericana Microbiología* 48: 211-225.
- Dong Y, Gusti A, Zhang Q, Xu J, Zhang L (2002) Identification of quorum-quenching N-Acyl homoserine lactonases from species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1754-1759.
- Escalante, AE (2007) Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas, En: *Ecología Molecular*; Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México. DF. pp: 393-424.
- Fallah AA, Saei-Dehkordi SS, Mahzounieh M (2013) *Occurrence* and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood products and market and processing environments in Iran. *Food control* 34: 630-636.
- Gaston KJ (1996) Species richness: measure and measurement. In: *Biodiversity: A biology of numbers and difference* Gaston KJ (ed.). Blackwell Science, Oxford University Press. Oxford, UK. pp: 77-113.
- Gatesoupe FJ (1991) The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbo, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96: 335-342.
- Gatti JP, Assunção AWA, Baldin JC, Amaral LA (2014) Microbiological quality of whole and filleted shelf-tilapia. *Aquaculture* 433: 196-200.

- Giraffa G, Neviani E (2001) DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67: 19-34.
- Ghosh S, Sinha A, Sahu C (2007) Effect of probiotic on reproductive performance in female live bearing ornamental fish. *Aquaculture Research* 38: 518-526.
- Goldschmidt-Clermont E, Wahli T, Frey J, Burr SE (2008) Identification of bacterial from the normal flora of perch *Perca fluviatili* L. and evaluation of their inhibitory potential towards *Aeromonas* species. *Journal of Fish Diseases* 31: 353-359.
- González-de la Cruz JU, Delfín-González H, de la Cruz-Leyva Ma C, Rojas-Herrera RA, Zamudio-Maya M (2011) Protocolo para la extracción de ADN metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus* L. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 875-883.
- González SF, Krug MJ, Nielsen ME, Santos Y, Call DR (2004) Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA Microarray. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1414-1419.
- Guerrero R, Berlanga M (2005) Microbios en la niebla: descubriendo el papel de los microbios en la biosfera. *Ecosistemas* 14: 3-10.
- Günther J, Jiménez-Montealegre, R (2004) Efecto del prebiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia *Oreochromis niloticus* y langostino *Macrobrachium rosenbergii* en laboratorio. *Revista de Biología Tropical* 52: 937-943.
- Hagi T, Tanaka D, Iwamura Y, Hoshino T (2004) Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* 234: 335-346.
- Halfpeter G, Moreno CE, Pineda EO (2001) Manual para evaluación de la biodiversidad en Reservas de la Biosfera. Vol 2. MT-Manuales y Tesis SEA (Sociedad Entomológica Aragonesa). CYTED. Zaragoza, España. 63 p.
- Handelsman J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 669-685.
- Handelsman J, Rondon M, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes, a new frontier for natural products. *Chemistry Biology* 5: 245-249.
- Henriques IS, Alves A, Tação M, Almeida A, Cunha Â, Correia A (2006) Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 68: 139-148.
- Hovda MB, Lunestad BT, Fontanillas R, Rosnes JT (2007a) Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture* 272: 581-588.
- Hovda MB, Sivertsvik M, Lunestad BT, Lorentzen G, Rosnes JT (2007b) Characterization of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut *Hippoglossus hippoglossus* based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiology* 24: 362-371.
- Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T, Gram L (2004) Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 96: 117-132.
- Huss HH (1997) Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Documento Técnico de Pesca. No. 334, FAO. Roma. 174 p.

- Irianto A, Austin B (2002) Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25: 333-342.
- Joost CAJ, Metzger K, Daniels R, Ptacek D, Verhoeven T, Habel LW, Vanderleyden J, de Vos DE, de Keersmaecker SCJ (2007) Synthesis of N-Acyl Homoserine lactone analogues reveals strong activators of sdiA, the *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* LuxR Homologue. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 535-544.
- Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS (2002) Isolating the Uncultivable microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296: 1127-1129.
- Kim DH, Brunt J, Austin B (2007) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1654-1664.
- Koch HW, Payne LW, Wentz AB, Cebula AT (1994) Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in Foods. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 556-560.
- Kozińska A (2007). Dominant pathogenic species of *mesophilic aeromonads* isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *Journal of Fish Diseases* 30: 293-301.
- Kumar R, Mukherjee SC, Pani PK, Pal AK (2006) Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham). *Aquaculture Research* 37: 1215-1221.
- Lategan MJ, Torpy FR, Gibson LF (2004) Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture* 240: 19-27.
- La Valley KJ, Jones S, Gomez-Chiarri M, Dealteris J, Rice M (2009) Bacterial community profiling of the eastern oyster *Crassostrea virginica*: Comparison of culture-dependent and culture-independent outcomes. *Journal of Shellfish Research* 28: 827-835.
- Le Nguyen DD, Ngoc HH, Dijoux D, Loiseau G, Montet D (2008) Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on *Pangasius* fish from Vietnam. *Food Control* 19: 454-460.
- Li J, Gao D, Wang J, Wang Q (2005) Efficacy of *Vibrio anguillarum* antigen administered by intraperitoneal injection route in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research* 36: 1104-1111.
- Liu W, Marsh TL, Cheng H, Forney JL (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- López LA, Zaballos M (2005) Diversidad y actividad procariótica en ecosistemas marinos. *Ecosistemas* 14: 30-40.
- Lyautey E, Lacoste B, Ten-Hage L, Rols J-L, Garabetian F (2005) Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research* 39: 380-388.
- Maeda M, Shibata A, Biswas G, Korenaga H, Kono T, Itami T, Saka M (2014) El aislamiento de bacterias del ácido láctico de Kuruma Camarones *Marsupenaeus japonicus* Intestino y Evaluación de la Función inmunomoduladora de una cepa seleccionada como probiótico. *Biotechnología Marina* 16: 181-192.
- Magnadottir B, Gudmundsdottir BK, Lange S, Steinarsson A, Oddgeirsson M, Bowden T, Bricknell I, Dalmo RA, Gudmundsdottir S (2006) Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases* 29: 147-155.

- Magurran AE (2004) Measuring biological diversity. An index of diversity. Blackwell Publishing. Oxford, UK. pp: 4-30.
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallt S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 2354-2359.
- McIntosh DJ, Forward BF, Puvanendran V Boyce, Ritchie D (2008) Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod *Gadus morhua* L and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture* 275: 42-50.
- Michel C, Claire P, Mekki B, Diane-Gaëlle D, Armand L, Patrick T (2007) Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2947-2955.
- Moreno CE (2001) Métodos para medir la biodiversidad. MTManuales y Tesis SEA (Sociedad Entomológica Aragonesa), CYTED. Vol. 1. Zaragoza, España. 84 p.
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 36-43.
- Mullis K, Erlich H, Arnheim N, Horn G, Saiki R, Scharf S (1987) Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. U.S. Patent 828144.
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- NOM-242-SSA1-2009 (2009) Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Norma Oficial Mexicana, Dirección general de normas. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5177531&fecha=10/02/2011. Fecha de consulta 8 de Julio de 2014.
- Noss, R (1990) Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical model. *Conservation Biology* 4: 355-364.
- Ochoa-Solano JL, Olmos-Soto J (2006) The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology* 23: 519-525
- Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 2: 39-50.
- Paillard C, Gausson S, Nicolas JL, le Pennec JP, Haras D (2006) Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253: 25-38.
- Panangala SV, Shoemaker AC, Klesius H (2007) TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture Research* 38: 508-517.
- Panicker G, Myers LM, Bej KA (2004) Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by RealTime-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 498-507.
- Panicker G, Bej AK (2005) Real-Time PCR Detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: Comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5702-5709.
- Payne MS, Hall MR, Bannister R, Sly L, Bourne DG (2006) Microbial diversity within the water column of a larval rearing system for the ornate rock lobster *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 258: 80-90.

- Purdy KJ, Nedwell DB, Embley TM (2003) Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic Archaeal populations in contrasting Antarctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3181-3191.
- Prol-García MJ, Planas M, Pintado J (2010) Different colonization and residence time of *Listonella anguillarum* and *Vibrio splendidus* in the rotifer *Brachionus plicatilis* determined by real-time PCR and DGGE. *Aquaculture* 302: 26-35.
- Ramette A (2009) Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2495-2505.
- Reynisson E, Lauzon HL, Magnússon H, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G, Marteinson V, Óli HG (2009) Bacterial composition and succession during storage of North-Atlantic cod *Gadus morhua* at superchilled temperatures. *BMC Microbiology* 9: 9-12.
- Rodríguez J, Espinosa Y, Echeverría F, Cárdenas G, Román R, Stern S (2007) Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273: 405-415.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Shannon C E, Weaver W (1963) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana. 128 p.
- Shen W-Y, Lin L-F, Li W-F, Zhu Y-R (2010) Efecto de la suplementación dietética con *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento, el rendimiento, la respuesta inmune y la actividad antioxidante de los camarones *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture research* 41: 1691-1698.
- SIRVETA (2004) Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos Brotes de ETA en América Latina 1997-2002. www.panalimentos.org/sirveta/e/index.htm. Fecha de consultado 27 de Febrero de 2014.
- Sujeewa AKW, Norrakiah AS, Laina M (2009) Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps *Penaeus monodon* and culture environment. *International Food Research Journal* 16: 89-95.
- Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiology* 5: 240-245.
- Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF (2002) Prokaryotic diversity- magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064-1066.
- Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J, Dunlap PV (2007) Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov. comb. nov. *Aliivibrio logei* comb. nov. *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2823-2829.
- Urdaci MC, Chakroun C, Faure D, Bernardet J-F (1998) Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Research in Microbiology* 149: 519-530.

- Villadas PJ, Martínez-Abarca F, Toro N (2002) Polymerase reaction-temperature gradient gel electrophoresis requires the use of high-performance liquid chromatography-purified oligonucleotides. *Analytical biochemistry* 300 101-103.
- Villanueva L, Navarrete A, Urmeneta J, White DC Guerrero, R (2007) Analysis of diurnal and vertical microbial diversity of a hypersaline microbial mat. *Archives of Microbiology* 88: 137-146.
- Villarreal, H. Álvarez, M. Córdoba, S. Escobar F, Fagua, G, Gast H, Mendoza F. Ospina M, Umaña, AM (2006) El Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. pp: 185-226.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatossava, T (2000) Detection identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 297-303.
- Ward LN, Bej AK (2006) Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2031-2042.
- Warner E, Oliver JD (2008) Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in Oysters *Crassostrea virginica* and Seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 80-85.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Wiklund T, Madsen L, Bruun MS, Dalsgaard I (2000) Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology* 88: 299-307.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 4576-4579.
- Woese C (1998) The universal ancestor. *Proceedings of the national academy of sciences* 95: 6854-6859.
- Yang G, Bao B, Peatman E, Li H, Huang L, Ren D (2007) Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus*. *Aquaculture* 262: 183-191.
- Zamudio-Maya M, Jiménez-Vera R, García-Lira A (2002) Evaluación de la calidad sanitaria microbiológicas de productos pesqueros de importancia para el estado de Yucatán. *Revista de la Facultad de ingeniería Química* 37: 17-22.
- Zarei M, Maktabi S, Ghorbanpour M (2012) Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* sp in seafood products using multiplex polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease* 9: 108-1129.
- Zengler K, Toledo G, Rappé M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Sëller M (2002) Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 5681-5686.