



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

"CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DE  
CULTIVOS LARVARIOS DE *Penaeus vannamei*  
AFECTADOS CON LA ENFERMEDAD DE LA NECROSIS  
AGUDA HEPATOPANCREÁTICA (AHPND)."

Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de  
Magíster en Biociencias Aplicadas con Mención en  
Biodescubrimiento

Presentado por:

Guillermo Antonio Reyes Román

Guayaquil – Ecuador, 2021

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt).

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM – ESPOL).

A la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia (CEDIA).

**DEDICATORIA**

A mi esposa y mi hijo, Betsy y Guillermo

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Firmado electrónicamente por:  
**BONNY NARCISA  
BAYOT ARROYO**

Bonny Bayot Arroyo, Ph.D  
Tutora de tesis



Firmado electrónicamente por:  
**MARY FERNANDA  
CASA VILLEGAS**

Mary Casa Villegas, Ph.D  
Cotutora de tesis



Firmado electrónicamente por:  
**EDUARDO JOSE  
CHICA  
MARTINEZ**

Milton Barcos Arias, Ph.D  
Miembro del tribunal

Eduardo Chica Martínez, Ph.D  
Miembro del tribunal

Julia Nieto Wigby, Ph.D  
Presidenta del tribunal

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

Guillermo A. Reyes

## RESUMEN

Ecuador es el mayor exportador de camarón de cultivo *Penaeus vannamei* en la región y uno de los más importantes a nivel mundial. Sin embargo, las enfermedades son la principal limitante de la producción. Actualmente, la enfermedad bacteriana causante de la necrosis aguda hepatopancreática (AHPND) provoca cuantiosas pérdidas en la industria camaronera. El objetivo del presente estudio fue caracterizar las comunidades bacterianas de cultivos larvarios de *P. vannamei* afectados con la enfermedad de la necrosis aguda hepatopancreática. Se recolectó muestras de 64 tanques de un laboratorio comercial que fue afectado naturalmente por bacterias causantes de AHPND. Las muestras que fueron confirmadas por PCR o histopatología se sometieron al análisis de la microbiota mediante la secuenciación de la región V3-V4 del 16S rRNA. Luego del diagnóstico PCR, los genes de toxina pirAB<sup>VP</sup> fueron detectados en 57 de 64 tanques. El análisis bioinformático identificó alrededor de 8626 ASVs en el total de las muestras. El índice de Simpson determinó diferencias significativas entre los estadios provenientes de tanques saludables. El análisis de similaridad (ANOSIM) de beta diversidad determinó diferencias significativas entre los tanques sanos y afectados por AHPND. El análisis discriminante lineal (LEfSe) y metagenomeSeq determinaron que los géneros *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Mameliella*, *Yangia* y *Pontibacterium* son biomarcadores de salud, mientras que *Gilvibacter*, *Cyclobacterium*, *Neptunomonas*, *Haliea* fueron biomarcadores de AHPND. Este estudio proporciona información de secuencias de bacterias que fueron significativamente abundantes en larvas sanas y podrían ser usadas como potenciales probióticos contra AHPND.

**Palabras clave:** AHPND, microbiota, estadios larvarios, LEfSe.

## ÍNDICE GENERAL

<b>CAPITULO 1.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Antecedentes y Justificación.....</b>	<b>11</b>
1.2 Objetivo General.....	12
1.3 Objetivos Específicos.....	12
<b>2. MARCO TEORICO.....</b>	<b>13</b>
<b>CAPITULO 2.....</b>	<b>15</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
3.1 Colección de las muestras.....	15
3.2 Procesamiento de las muestras.....	15
3.3 Diagnóstico de AHPND y selección de muestras.....	16
3.4 Extracción de ADN y secuenciación Illumina.....	16
3.5 Procesamiento de secuencias.....	17
3.6 Medidas de diversidad y análisis estadístico.....	18
<b>CAPITULO 3.....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 Diagnóstico de AHPND y selección de muestras.....	19
4.2 Procesamiento de secuencias.....	20
4.3 Alfa diversidad de las comunidades bacterianas.....	21
4.4 Abundancia de taxon bacterianas.....	21
4.5 Diferencias en las comunidades bacterianas.....	24
<b>CAPITULO 4.....</b>	<b>27</b>
<b>5. DISCUSION.....</b>	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>31</b>

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFA	Alcohol Etílico, Formol, Ácido Acético Glacial
AHPND	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease
ANOSIM	Analysis of Similarities
ASV	Amplicon Sequence Variant
DA	Differential Abundance
eDNA	Environmental DNA
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FDR	False Discovery Rate
gDNA	Genomic Deoxyribonucleic Acid
HTS	High Throughput Sequencing
LDA	Linear Discriminant Analysis
LEfSe	Linear Discriminant analysis Effect Size
OIE	Office International des Epizooties
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCoA	Principal Coordinates Analysis
pirAB <sup>VP</sup>	PirA and PirB toxin genes VP.
RDP	Ribosomal Data Project
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TSB	Tryptic Soy Broth
VP	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>



## SIMBOLOGIA

g	Gramos
kbp	Kilobases
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
pb	Pares de Bases
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
μL	Microlitros
μm	Micrómetro o micra
°C	Grados centígrados
≈	Aproximadamente

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Procesamiento de muestras de larvas de <i>P. vannamei</i> para la secuenciación de la microbiota.....	17
<b>Figura 2.</b> Flujo de trabajo del análisis bioinformático, preprocesamiento hasta la inferencia estadística de los datos.....	18
<b>Figura 3.</b> Cortes histológicos de larvas de camarón colectadas en un laboratorio comercial .....	20
<b>Figura 4.</b> Alfa diversidad utilizando Shannon a nivel de ASV .....	21
<b>Figura 5:</b> Composición taxonómica de la comunidad bacteriana en los tanques sanos y afectados por AHPND.....	23
<b>Figura 6:</b> Distancia de Bray-Curtis de tanques sanos y afectados con AHPND.....	24
<b>Figura 7.</b> Árbol filogenético de calor al nivel de género.....	25
<b>Figura 8.</b> Análisis discriminante lineal (LDA) con tamaño del efecto (LEfSe).....	26

# CAPITULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1 Antecedentes y Justificación

El camarón de cultivo, *Penaeus vannamei*, es la especie más importante en el comercio de productos del mar a nivel mundial, representando el 80 % de la producción total de camarones peneidos cultivados. Sin embargo, las enfermedades son una de las limitantes para la industria camaronera. El Banco Mundial ha estimado que las pérdidas por efecto de las enfermedades exceden los \$ 6 mil millones por año (Brummett et al., 2014). Por ejemplo, las pérdidas estimadas que ocasiona el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV – White Spot Syndrome Virus) llegan a \$ 2 mil millones para Asia, y entre \$ 1-2 mil millones para Latinoamérica (Lightner et al., 2012).

Ecuador es el mayor exportador mundial de camarón *P. vannamei* en la región (FAO, 2020). En el aspecto nacional, el camarón es el primer producto no petrolero de exportación, y en 2020 generó ingresos de \$ 3.823 millones a la economía (BCE, 2020). Históricamente, los problemas epidémicos son una de las principales amenazas para el sector camaronero del país. Entre 1999 y 2003, WSSV ocasionó pérdidas de más de \$ 1.200 millones (García, 2003), demostrando la importancia de implementar nuevas alternativas de control.

Al momento, uno de los principales problemas epidémicos son ocasionados por bacterias del género *Vibrio*, siendo la necrosis aguda hepatopancreática (AHPND) la enfermedad más emergente (Thitamadee et al., 2016; Tran et al., 2013). AHPND afecta a camarones de cultivo *P. vannamei* y *P. monodon* a lo largo del ciclo de vida, puede propagarse fácilmente en el medio circundante de cultivo y llegar a ocasionar el 100 % de mortalidad (de la Peña et al., 2015; Kongrueng et al., 2015). Las cepas de vibrios que producen AHPND contienen plásmidos de aproximadamente 70 kbp, portadores de genes codificantes para dos toxinas: PirA y PirB (pirAB<sup>VP</sup>), descritas para *Photorhabdus* sp. (Dangtip et al., 2015). Como parte de la patogénesis de AHPND, estas toxinas son liberadas en el sistema digestivo de los camarones donde ocasionan una descamación severa de las células del hepatopáncreas y la consecuente muerte del camarón infectado (Han et al., 2015).

La diversidad de especies e individuos que conforman la microbiota intestinal desempeñan funciones críticas en un huésped, como la absorción de nutrientes y defensa de patógenos (Dai et al., 2020). Algunas bacterias aisladas en camarón otorgan efectos benéficos para el huésped, como antagonismo contra bacterias patógenas y mejoramiento del sistema inmune (Balcázar et al., 2007;

Gullian et al., 2004), mientras que otras bacterias son causales de enfermedades de gran impacto económico, entre ellas: *Vibrio harveyi* (Haldar et al., 2011; I. Karunasagar et al., 1994; Mirbakhsh et al., 2014; Robertson et al., 1998; J. Vandenberghe et al., 1998; Johan Vandenberghe et al., 1999), *Vibrio alginolyticus* (Hasan et al., 2017; Karunasagar et al., 1998) y *Vibrio campbellii* (Haldar et al., 2011; Hameed, 1995; Soto-Rodríguez et al., 2006), patógenos recurrentes en larviculturas de camarón de muchos países productores.

Pese a que, la composición bacteriana ejerce un efecto importante sobre la resistencia o susceptibilidad a enfermedades (Zheng et al., 2017), la mayoría de las investigaciones han caracterizado el microbioma de *P. vannamei* en estadíos juveniles (Chen et al., 2017; Cornejo-Granados et al., 2017) y pocas veces en condiciones de salud y enfermedad. Hasta el momento, no se conoce de estudios sobre la comunidad bacteriana en estadíos larvarios de camarón en condiciones específicas de afectación por AHPND. Dado que, los estudios en camarones juveniles *P. vannamei* afectados por AHPND muestran diferencias significativas entre las microbiotas de camarones sanos y enfermos, es plausible hipotetizar que igual situación ocurriría en larvas de camarón. Considerando que, las larviculturas de camarón son la base de la pirámide de producción que abastecen de semillas a miles de productores de engorde de camarón en Ecuador, es necesario implementar herramientas de control para mitigar a AHPND desde los estadíos tempranos de cultivo. En este contexto, en la presente investigación se utilizó secuenciación de alto rendimiento (High Throughput Sequencing - HTS) para caracterizar la microbiota bacteriana de diversos estadíos larvarios de camarón *P. vannamei* que fueron afectados por AHPND y compararlos con la microbiota de cultivos larvarios sanos. Se identificaron potenciales biomarcadores asociados a cultivos saludables y afectados por AHPND, lo cual representa una contribución necesaria de trasladar la información molecular y genómica para el tratamiento de las enfermedades bacterianas del camarón.

## 1.2 Objetivo General

Caracterizar las comunidades bacterianas de cultivos larvarios de *Penaeus vannamei* afectados con la enfermedad de la necrosis aguda hepatopancreática.

## 1.3 Objetivos Específicos

Comparar las microbiotas de cultivos larvarios de *P. vannamei* saludables y afectados con la enfermedad de la necrosis aguda hepatopancreática.

Identificar biomarcadores asociados a cultivos larvarios de *P. vannamei* saludables y afectados con la enfermedad de la necrosis aguda hepatopancreática.

## 2. MARCO TEÓRICO

AHPND afecta a camarones de cultivo *P. vannamei* y *P. monodon* a lo largo del ciclo de vida (Deris et al., 2020; Peña-Navarro et al., 2020). La enfermedad es causada por cepas bacterianas específicas de vibrios de los clados *Harveyi* (*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* (Kondo et al., 2015), *V. owensii* (Liu et al., 2015), *V. campbellii* (Dong et al., 2017) y *V. orientalis* (Restrepo et al., 2018)) y se caracteriza por cambios en el comportamiento del camarón, como lentitud, nado errático en espiral y alimentación reducida, a nivel de tejido, presenta signos de atrofia y lesiones en el hepatopáncreas del camarón, a pesar de infectar con una población baja de bacterias (Santos et al., 2020).

Conocida anteriormente como síndrome de la mortalidad temprana (EMS) en 2016 fue incluida en la lista de la OIE (Yu et al., 2021) por provocar mortalidades repentinas y masivas en etapas de larva y engorde. *V. parahaemolyticus*, el causante más conocido de AHPND, es una bacteria gram-negativa, ubicua en el ambiente y los medios de producción (Sirikharin et al., 2015). Estas bacterias poseen un plásmido extracromosómico pVA1 (70 kbp) que porta los genes de los principales factores de virulencia de AHPND (Xiao et al., 2017) codificantes de las toxinas PirA y PirB descritos para *Photobacterium* sp. (Dangtip et al., 2015). El plásmido puede ser transferido entre clados de alta similitud por la acción de elementos genéticos móviles codificantes de una transposasa responsable de la transferencia horizontal de genes (HGT) (Han et al., 2015), la transferencia de genes a través de eventos de recombinación, conjugación y captación de plásmidos es un proceso conocido de conversión de cepas no patógenas que incrementan la propagación de AHPND (Restrepo et al., 2018).

Adicionalmente, nuevas cepas patógenas como *V. owensii*, *V. inhibens* y *V. natriegens* han emergido en las larviculturas comerciales, diversificando la plétora de bacterias patógenas en los sistemas de producción, para las cuales, los antimicrobianos comerciales no son muy efectivos (Sotomayor et al., 2019). Para prevenir complicaciones y brotes de la enfermedad, se han implementado técnicas para identificar al agente, tales como: bioensayos (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015), histopatología, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dangtip et al., 2015), biosensores biológicos (Rizan et al., 2018) y ADN ambiental eDNA (Goldberg et al., 2016). Los diagnósticos principales más utilizados son histopatología y PCR, que han permitido observar y confirmar los daños ocasionados por AHPND. Mediante técnicas histológicas se ha descrito que AHPND ocasiona descamación y el redondeo masivo de células epiteliales del túbulo hepatopancreático que termina en necrosis, mientras que PCR confirma la presencia de AHPND mediante cebadores dirigidos a amplificar secuencias de ADN específicas del patógeno, actualmente el juego de iniciadores de mayor sensibilidad, AHPND 4 (AP4) y el método de dúplex

PCR para los genes PirA y PirB son las pruebas confirmatorias comúnmente utilizadas (Santos et al., 2020) y que han sido reconocidas por la OIE (Yu et al., 2021).

El microbioma intestinal es el conjunto de microorganismos que cumplen funciones críticas en un huésped, la mayoría de ellas, ligadas a la salud del animal y la resistencia o susceptibilidad a enfermedades, por lo tanto, el microbioma es considerado objeto de estudio para determinar el éxito de los cultivos. A pesar de que se conoce de los efectos benéficos del microbioma en camarón *P. vannamei*, la mayoría de las investigaciones han caracterizado las comunidades bacterianas comparando etapas de desarrollo de juveniles (Zeng et al., 2017), órganos del camarón (Tzuc et al., 2014), dietas con fuentes de lípidos junto a otros aditivos (Zhang et al., 2014), ecosistemas de diferentes países (Zoqratt et al., 2018), sistemas de cultivo (Gainza et al., 2018), funciones de la microbiota en el huésped (Garibay-Valdez et al., 2020), microbiota asociada con el peso (Fan et al., 2019), agua y sedimento presentes en el cultivo (Huang et al., 2018). Pocos estudios se han desarrollado para estudiar la microbiota frente a condiciones de salud y enfermedades específicas.

Con respecto a AHPND, algunos análisis comparativos entre camarones juveniles sanos y afectados revelaron taxas que estuvieron significativamente enriquecidas en cada una de las condiciones, por ejemplo: *Faecalibacterium prausnitzii* y *Pantoea agglomerans* estuvieron asociadas a condiciones saludables, mientras que, *Aeromonas taiwanensis*, *Simiduia agarivorans* y *Photobacterium angustum* a condiciones de enfermedad (Cornejo-Granados et al., 2017). En los estadios larvarios, son escasos los estudios dirigidos a la microbiota frente a condiciones de salud y enfermedad. Hasta el momento, se conoce de las comunidades microbianas de diferentes etapas de desarrollo y agua de cultivo (Wang et al., 2020a; Wang et al., 2020b). Mientras que las comunidades bacterianas coexistentes en estadios larvarios de camarón en condiciones específicas de afectación por AHPND aún se desconoce.

## CAPITULO 2

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Colección de las muestras

Se colectaron larvas de camarón *P. vannamei*, durante el ciclo de producción en 64 tanques espacialmente distribuidos por módulos (Tabla suplementaria I) de un laboratorio comercial localizado en Mar Bravo (Santa Elena, Ecuador) (Figura suplementaria 1). El muestreo se realizó en cada tanque durante las etapas de desarrollo de mysis 3 (M3), postlarva 4 (PL4), postlarva 7 (PL7) y postlarva 10 (PL10), para un total de 246 muestras de larvas colectadas (Tabla suplementaria I). En cada muestreo, se realizó la observación de signos externos de la enfermedad (comportamiento de lentitud, nado errático y tracto digestivo vacío). Los parámetros de calidad de agua en los tanques muestreados estuvieron en los rangos óptimos para cultivo de larvas de camarón (concentración de oxígeno disuelto: 5.0 mg/L, temperatura: 32.5 - 33.0 °C y pH: 7.9 - 8.1). Todos los tanques tuvieron el mismo protocolo de manejo de recambio de agua y administración de dosis y frecuencia de cuatro probióticos comerciales. Por lo tanto, para determinar si los probióticos estuvieron presentes en la microbiota larval, muestras de probióticos y alimento comercial fueron preservadas. El porcentaje de supervivencia de cada tanque fue registrado al final del ciclo de producción (postlarva 11).

#### 3.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras de larvas fueron transportadas hasta las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIME, Santa Elena, Ecuador). En condiciones asépticas de laboratorio, 20 larvas de cada muestra a partir del estadio de postlarva 7, fueron preservadas en solución fijadora Davidson AFA para la posterior examinación histopatológica. Además,  $\approx$  1 g de cada muestra fue lavada con solución salina estéril al 1% para remover impurezas y microorganismos externos. Las muestras fueron maceradas en un tubo de microcentrífuga (1.5 mL) para la homogeneización de la carga bacteriana, distribuyendo 100  $\mu$ L para diagnóstico de AHPND y 500  $\mu$ L para el análisis de la microbiota (Figura suplementaria 2). Para el análisis posterior de la microbiota, las muestras fueron colocadas en tubos crioviales (1.5 mL) y se sumergieron en nitrógeno líquido por 30 min (Snapshot freezing), posteriormente fueron almacenados en un congelador a -80 °C hasta su procesamiento (Figura suplementaria 3).

### 3.3 Diagnóstico de AHPND y selección de muestras

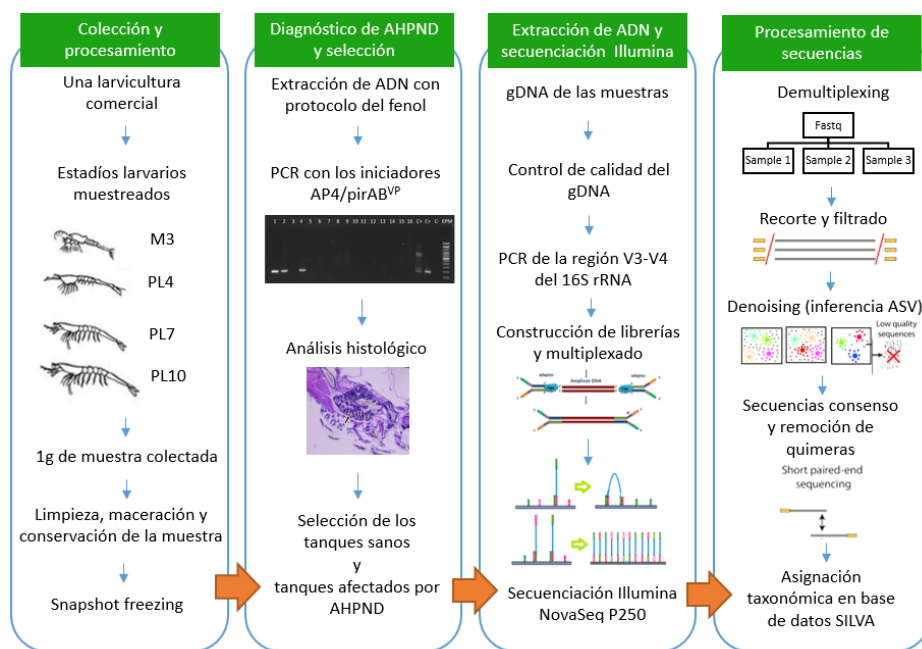
Todas las muestras se analizaron para el diagnóstico de AHPND por análisis de PCR. Previamente, se realizó un enriquecimiento para incrementar la sensibilidad de la detección de AHPND. Brevemente 100  $\mu$ L de una segunda dilución seriada (1:10) de tejido macerado con solución salina estéril al 1% fue inoculada en caldo tripticosa soya (TSB) líquido (Figura suplementaria 4A). Para la extracción de ADN genómico (gDNA), 1000  $\mu$ L de cultivo bacteriano fueron centrifugados a 8000 rpm por 2 min. La lisis celular se realizó con 500  $\mu$ L de buffer TE de lisis modificado (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA). La suspensión se incubó y agitó con 75  $\mu$ L de SDS al 10 % por 1 hora a 55 °C y 1500 rpm en un termo-bloque HM100-PRO (DLAB Scientific, Beijing, China) (Figura suplementaria 4B). Se realizó extracción de ADN con 600  $\mu$ L de fenol-cloroformo, se agitó con vortex (10 s), se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y se separó el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 1 volumen de cloroformo-Isoamil 24:1, se agitó con vortex y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue recuperado y el ADN bacteriano fue precipitado por 1 hora a -20 °C con 2.5 volúmenes de etanol frío grado biología molecular y 0.5 volúmenes de acetato de amonio 5 M. Para la precipitación de ADN, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado dos veces, con 300  $\mu$ L de etanol al 70 %, se centrifugó a 10000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante (Figura suplementaria 4C). Finalmente, el pellet fue secado a 45 °C durante 1 hora y re-suspendido en 50  $\mu$ L de agua ultrapura Mili-Q. La amplificación se realizó mediante PCR anidado, los iniciadores y condiciones de amplificación usadas para la detección de AHPND fueron los mismos descritos por Dangtip et al. (2015) y Han et al. (2015a) (Tabla suplementaria II), y fueron realizadas en un termociclador punto final (Applied Biosystems, California, EEUU) (Figura suplementaria 4D). Los productos amplificados de PCR fueron verificados con electroforesis en un gel de agarosa del 1.5 % (100 V, por 30 min), disuelto en buffer TAE y suplementado con SYBR® Safe 10.000x (Invitrogen). La visualización de los productos amplificados se realizó con un fotodocumentador UV (Enduro GDS Labnet, New Jersey, EEUU). Solamente las muestras que resultaron positivas (+) luego del análisis de PCR o histopatología fueron seleccionadas para el análisis de la microbiota.

### 3.4 Extracción de ADN y secuenciación Illumina

El ADN genómico de las muestras fue extraído mediante el kit de aislamiento ZymoBionics DNA Microprep Kit (Zymo Research, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvo 25  $\mu$ L de gDNA diluido en agua ultrapura libre de DNasa. La concentración (20 ng/  $\mu$ L) y calidad (1.8 - 2.0 A260/280) del gDNA fueron leídas en un espectrofotómetro micro UV-Vis de barrido espectral NanoDrop One (Thermo Scientific, EEUU) (Tabla



suplementaria III) y migrado en un gel de agarosa 1.5 % para la óptima amplificación PCR. Se amplificaron las regiones hipervariables 16S rRNA V3-V4 con los iniciadores 341F y 806R (470 pb). Las muestras fueron enviadas a Novogene Inc. Sacramento CA, EEUU para la amplificación, construcción de librerías, multiplexado y secuenciación con la plataforma Illumina NovaSeq 6000 P250 (Figura 1).



**Figura 1.** Procesamiento de muestras de larvas de *P. vannamei* para la secuenciación de la microbiota.

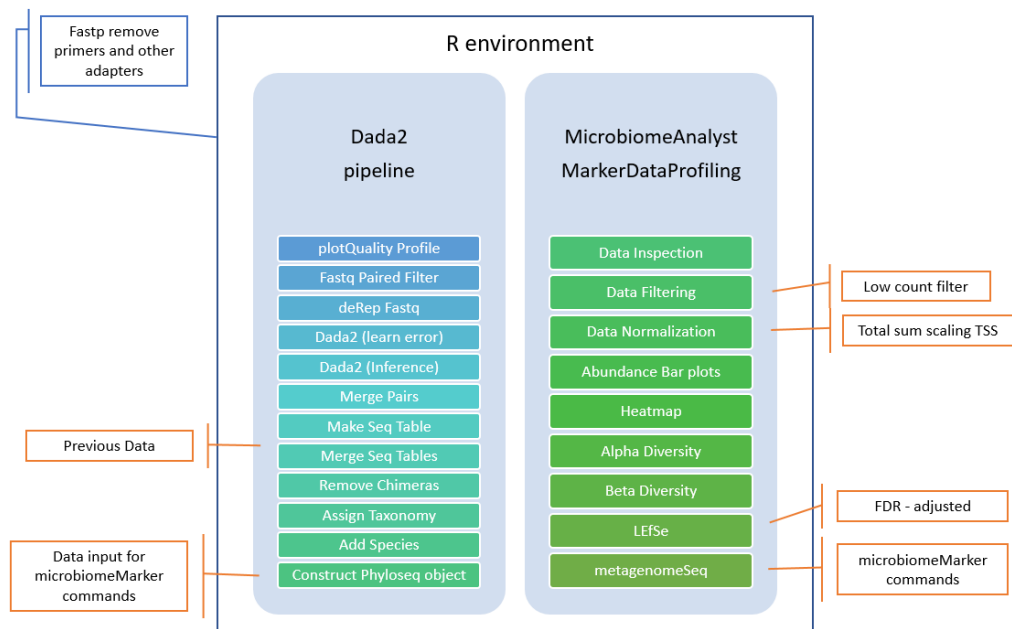
### 3.5 Procesamiento de secuencias

Las lecturas de extremo emparejado (paired-end reads) sin adaptadores (demultiplexing), ni cebadores fueron procesadas en condiciones específicas de recorte y filtrado para obtener lecturas de alta calidad (Phred Score  $Q_{30} \geq 80$  %). Se realizó la inferencia (*denoising*) de las lecturas en ASV (amplicon sequence variant), el solapado de las lecturas (contig de lecturas desnoizadas) y eliminación de quimeras mediante DADA2 pipeline versión 1.16 (Callahan et al., 2016). Luego de realizar la asignación taxonómica en la base de datos pública SILVA versión 138.1, se obtuvieron tablas de secuencia de ASV y de taxonomía, que fueron enrarecidas al mínimo número de lecturas.

### 3.6 Medidas de diversidad y análisis estadístico

La diversidad alfa fue estimada con los índices Shannon, Simpson y el estimador de riqueza ACE. La prueba de Kruskal-Wallis fue aplicada para

evaluar la diferencia de riqueza y uniformidad de las comunidades bacterianas entre los estadios. La hipótesis nula de igualdad de diversidad fue rechazada con valores de  $p \leq 0.05$ . La prueba por pares para las comparaciones múltiples basadas en las sumas de rango promedio de Nemenyi (prueba post-hoc) fue utilizada para evaluar la diferencia estadística de la diversidad alfa entre estadios de desarrollo larval, lo cual se realizó tanto para las muestras colectadas en los tanques de larvas sanas, como para los tanques donde las larvas fueron afectadas por AHPND. La profundidad de secuenciación fue inspeccionada con el rango de cobertura de Good. La diversidad beta fue evaluada mediante la métrica de Bray-Curtis y visualizada en un análisis de coordenadas principales (PCoA). La diferencia en la microbiota de larvas sanas y afectadas por AHPND fue evaluada con un análisis de similaridad (ANOSIM). La Prueba no paramétrica de Wilcoxon fue aplicada para observar la abundancia significativa de taxas pertenecientes a diferentes niveles taxonómicos. Para observar la jerarquía de las taxas significativamente abundantes en los tanques sanos y afectados por AHPND, se construyó un árbol de calor a partir del paquete metacoder en R (Foster et al., 2017). Adicionalmente, se aplicaron pruebas de abundancia diferencial (DA) como el análisis discriminante lineal (LDA) acompañado del tamaño del efecto (LEfSe) (Segata et al., 2011) y metagenomeSeq (Paulson et al., 2013) para identificar bacterias enriquecidas significativamente. Los análisis estadísticos fueron realizados en R, con los paquetes: MicrobiomeAnalyst (Dhariwal et al., 2017) y microbiomeMarker (Yang, 2020). La figura 2 resume el flujo del análisis bioinformático.



**Figura 2.** Pre-procesamiento de secuencias hasta la inferencia estadística de los datos.

## CAPITULO 3

### 4. RESULTADOS

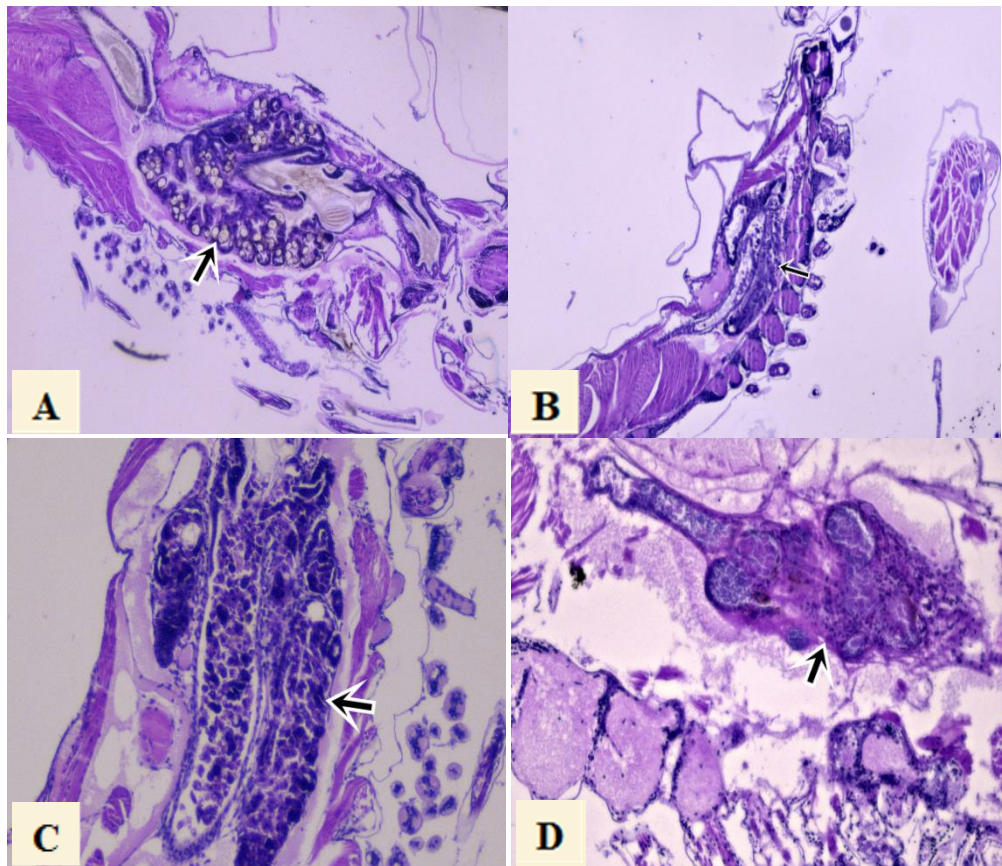
#### 4.1 Diagnóstico de AHPND y selección de muestras

Luego de un monitoreo exhaustivo realizado a 64 tanques de larvicultura comercial, los resultados del diagnóstico por PCR mostraron que los genes de toxina pirAB<sup>VP</sup> fueron detectados en 57 tanques (Tabla suplementaria IV). Al finalizar el ciclo de producción, la supervivencia superior al 50 % fue observada en 8 de los 64 tanques, localizados en los módulos A, E y F. El tanque 9 del módulo E y el tanque 5 del módulo A presentaron supervivencias del 39 y 47%. En tanto que, 33 tanques exhibieron supervivencia menor al 25 %, y 21 tanques exhibieron 100 % de mortalidad, en la mayoría localizados en los módulos C y D (Tabla suplementaria V).

Durante la observación de signos clínicos externos, las larvas de los tanques de los módulos A y E fueron las que mostraron menor severidad (Tabla suplementaria VI), seguido de las larvas de tanques del módulo F. En contraste, las larvas de los módulos C y D presentaron la mayor severidad de signos de la enfermedad de AHPND (Tabla suplementaria VII).

El análisis de histopatología determinó la presencia de daños característicos de AHPND. Para objeto de comparación, la Figura 3A muestra el corte histológico de una larva cuyos tejidos y órganos están sin afección. Mientras que, las figuras 3B, 3C y 3D muestran las observaciones histológicas típicas de animales cursando una infección severa de AHPND. Se observó el desprendimiento severo de células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas e infiltraciones hemocíticas y pérdida de la función de las células, lo que corresponde a la fase aguda de AHPND (Figuras 3B y 3C). Así como pérdida de la estructura de los túbulos del hepatopáncreas y nódulos hemocíticos melanizados correspondientes a la fase terminal de AHPND (Figura 3D).

Los resultados del análisis de PCR e histopatología permitieron seleccionar al tanque 10 del módulo E por no presentar genes de toxina pirAB<sup>VP</sup> ni daños característicos de AHPND, además de exhibir alta supervivencia al finalizar el ciclo de producción. Los tanques 3, 4 y 5 del módulo B, fueron seleccionados por ser positivos a AHPND y exhibir bajos porcentajes de supervivencia.



**Figura 3.** Cortes histológicos de larvas de camarón colectadas en un laboratorio comercial. **A.** Larva de camarón *P. vannamei* PL10 del tanque 10 (Módulo E). Se observa la estructura de los túbulos del hepatopáncreas (10x) en condiciones normales (flecha). **B.** Larva de camarón *P. vannamei* PL7 del tanque 2 (Módulo D). Se observa el desprendimiento severo de células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas e infiltraciones hemocíticas y pérdida de la estructura de las células (4x), lo que corresponde a la fase aguda de AHPND (flecha). **C.** Larva de camarón *P. vannamei* PL7 del tanque 2 (Módulo D). Se observa el desprendimiento severo de células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas e infiltraciones hemocíticas y pérdida de la función de las células (10x), lo que corresponde a la fase aguda de AHPND (flecha). **D.** Larva de camarón *P. vannamei* PL10 del tanque 8 (Módulo B). Se observa pérdida de la estructura de los túbulos del hepatopáncreas y nódulos hemocíticos melanizados (10x), lo que corresponde a la fase terminal de AHPND (flecha).

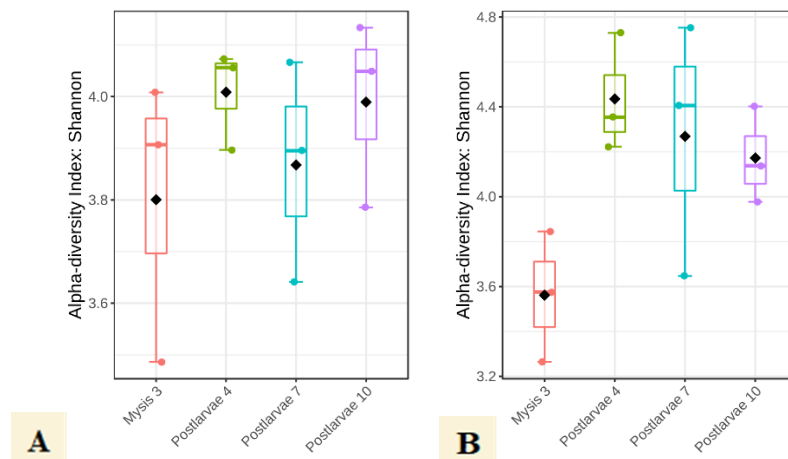
#### 4.2 Procesamiento de secuencias

Las muestras aprobaron el control de calidad (n= 28) y pudieron culminar el proceso de secuenciación (Tabla suplementaria VIII). Luego de la eliminación de adaptadores e iniciadores, el filtrado de calidad otorgó alrededor de 8 millones de lecturas limpias. Con un promedio de 149,000 lecturas por muestra

(rango de 130,000 - 160,000). El ratio de error tuvo un promedio de 0.03% para todas las lecturas. En promedio el 88 % de las lecturas tuvieron una puntuación Phred >Q30 y un contenido de GC del 53 % (Tabla suplementaria IX). Para el alineamiento, se promedió una longitud de lectura de 250 bp. Se obtuvo un total de 8626 ASVs, que representó un promedio de 400 ASVs por cada muestra. Las muestras fueron enrarecidas hasta la cantidad de 77,226 secuencias por muestra, suficientes para capturar la diversidad alfa de las comunidades microbianas durante los estadios larvarios (Figura suplementaria 5). El rango de la cobertura de Good fue del 99.99 a 100 %, lo que indica una óptima profundidad de secuenciación para caracterizar las comunidades bacterianas.

#### 4.3 Diversidad alfa de las comunidades bacterianas

En este estudio, el índice de Shannon no mostró diferencias significativas entre los estadios de los tanques con larvas sanas ( $p = 0.546$ ), y de igual manera, entre los estadios de tanques con larvas afectadas por AHPND ( $p = 0.118$ ) (Figura 4). El índice ACE no mostró diferencias significativas entre los estadios de tanques sanos ( $p = 0.21$ ), y de la misma manera, los estadios de tanques afectados por AHPND ( $p = 0.191$ ) (Figura suplementaria 6). El índice de Simpson de los estadios de tanques sanos mostró diferencias significativas ( $p = 0.040$ ). Luego de la prueba post-hoc de Nemenyi, los estadios de mysis 3 y postlarva 4 presentaron la mayor diferencia ( $p = 0.04$ ) (Figura suplementaria 6).

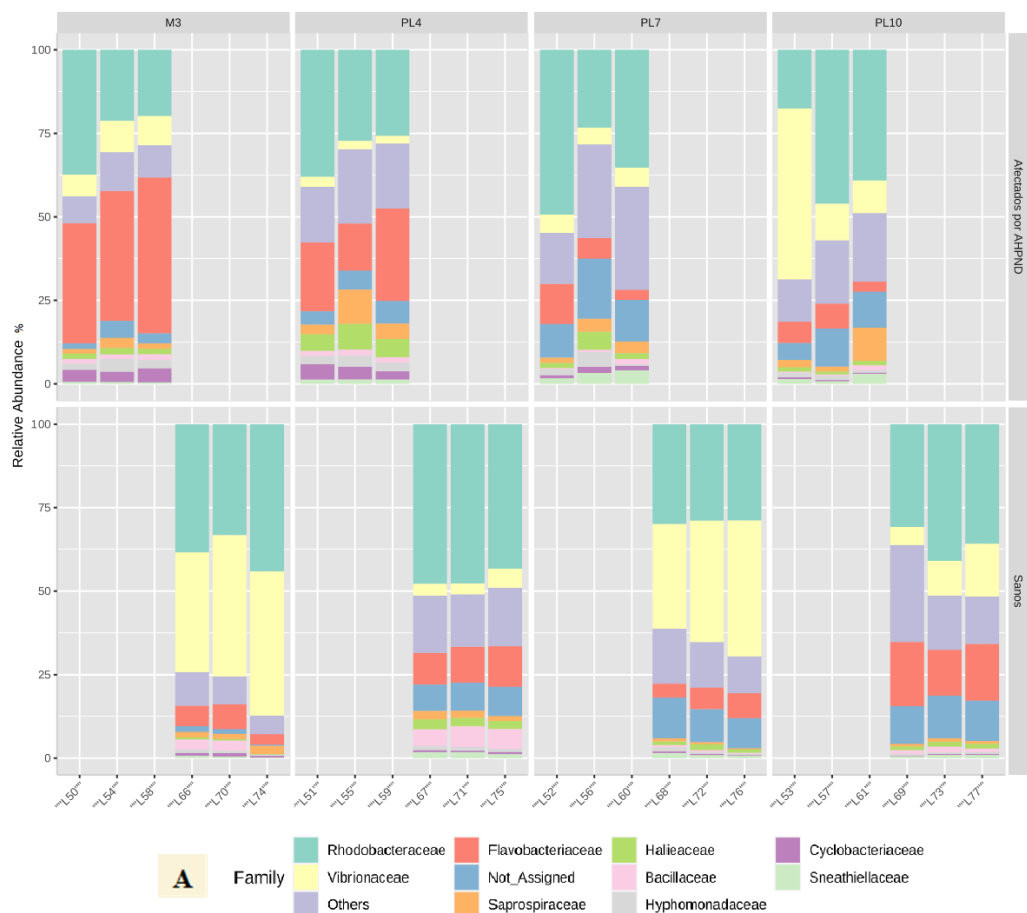


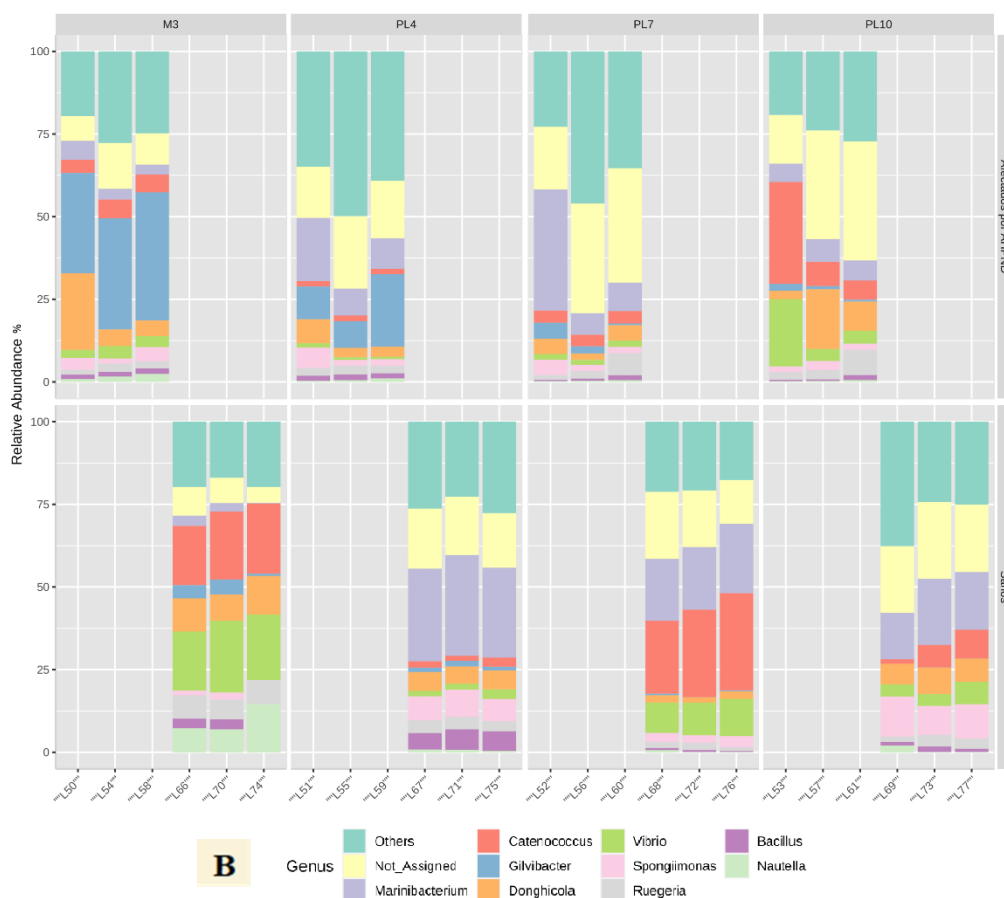
**Figura 4.** Alfa diversidad utilizando Shannon a nivel de ASV. Cada diagrama de caja representa la distribución de diversidad bacteriana dentro de los estadios larvarios **A.** Estadios de tanques sanos y **B.** Estadios de tanques afectados por AHPND.

#### 4.4 Abundancia de taxás bacterianas

Se identificó 16 Phylum, 29 clases, 76 órdenes, 107 familias, 185 géneros y 59 especies en las muestras de larvas sanas y afectadas por AHPND. Los estadios

sanos y afectados por AHPND fueron dominados por el Phylum *Proteobacteria*. Sin embargo, el porcentaje de *Bacteroidota* estuvo incrementado en estadios de tanques afectados por AHPND (Figura suplementaria 7 y 8). La clase *Alphaproteobacteria* fue dominante en larvas sanas y enfermas, *Gammaproteobacteria* y *Bacilli* exhibió mayor abundancia en larvas sanas. Mientras que, *Bacteroidia* en larvas enfermas (Figura suplementaria 9). El Orden *Rhodobacterales* fue dominante en larvas sanas y enfermas, *Flavobacteriales* exhibió mayor abundancia en larvas sanas, mientras que *Enterobacterales* en larvas enfermas (Figura suplementaria 10). A nivel de familia, *Vibrionaceae* exhibió dominancia en los estadios de mysis 3 y postlarva 7 de los tanques sanos. *Flavobacteriaceae* fue dominante en mysis 3 de tanques afectados por AHPND. Mientras que *Rhodobacteraceae* mantuvo la dominancia en el resto de los estadios. A nivel de género, *Catenococcus* exhibió dominancia en el estadio de mysis 3 y postlarva 7 de los tanques sanos. Mientras que *Gilvibacter* fue dominante en mysis 3 de los tanques afectados por AHPND.





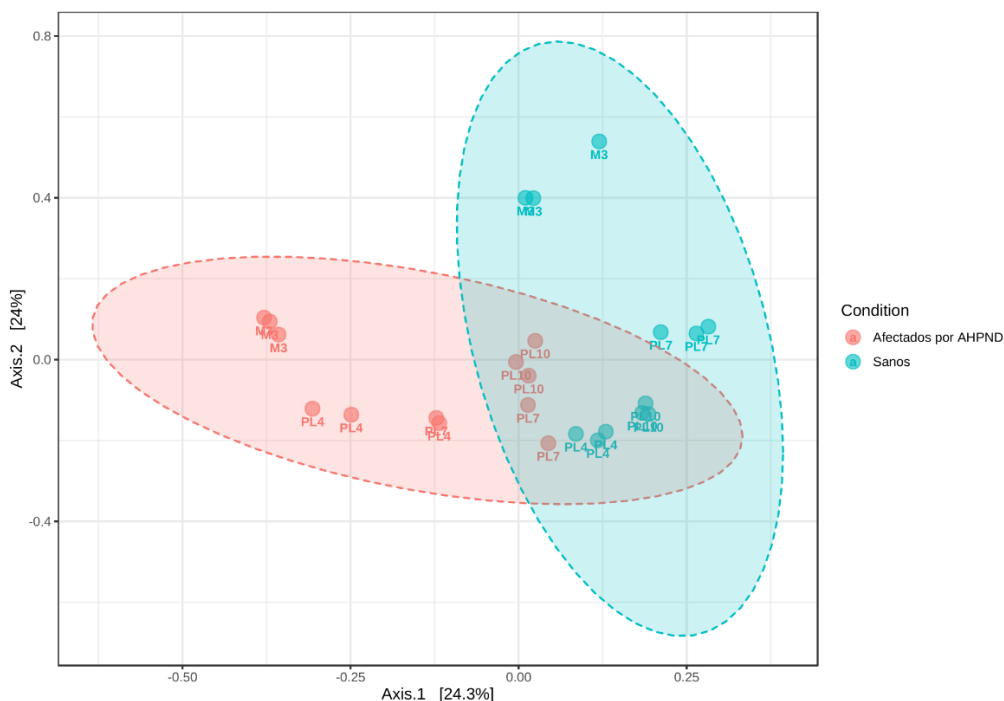
**Figura 5:** Composición taxonómica de la comunidad bacteriana en los tanques sanos y afectados por AHPND **A.** Familia **B.** Género.

El género *Vibrio* tuvo mayor presencia a lo largo de los estadíos de tanques sanos en comparación a los afectados por AHPND. El género *Marinibacterium* exhibió dominancia en postlarva 4 de los tanques sanos y en el resto de estadíos sanos fue mayormente abundante en comparación a todos los estadíos afectados por AHPND. (Figura 5).

Las muestras de probióticos fueron dominadas por los Phylum *Firmicutes*, *Proteobacteria*, y las familias *Lactobacillaceae*, *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*. A nivel de género, el probiótico 1 fue dominado por *Lentilactobacillus* (ASV-13), el probiótico 2 por *Bacillus* (ASV-8, ASV-9, ASV-52), el probiótico 3 por *Clostridium* (ASV-41), y el probiótico 4 (ASV-23) por *Weissella*. La muestra de alimento comercial fue dominada por los Phylum: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, y la familia *Lactobacillaceae*, *Bacillaceae* y *Vibrionaceae*, y los géneros: *Lactobacillus* y *Bacillus* (Figura suplementaria 11). Los ASVs encontrados en las muestras de probióticos mostraron baja abundancia (< 0.01 %) en las muestras de larvas.

#### 4.5 Diferencias entre las comunidades bacterianas

Los análisis comparativos de beta diversidad fueron realizados entre todas las muestras usando el índice Bray-Curtis y análisis de similitud (ANOSIM) a nivel de ASV. Las muestras de los estadios larvarios de tanques afectados por AHPND fueron distintos de los tanques sanos ( $p = 0.001$ ) (Figura 6).



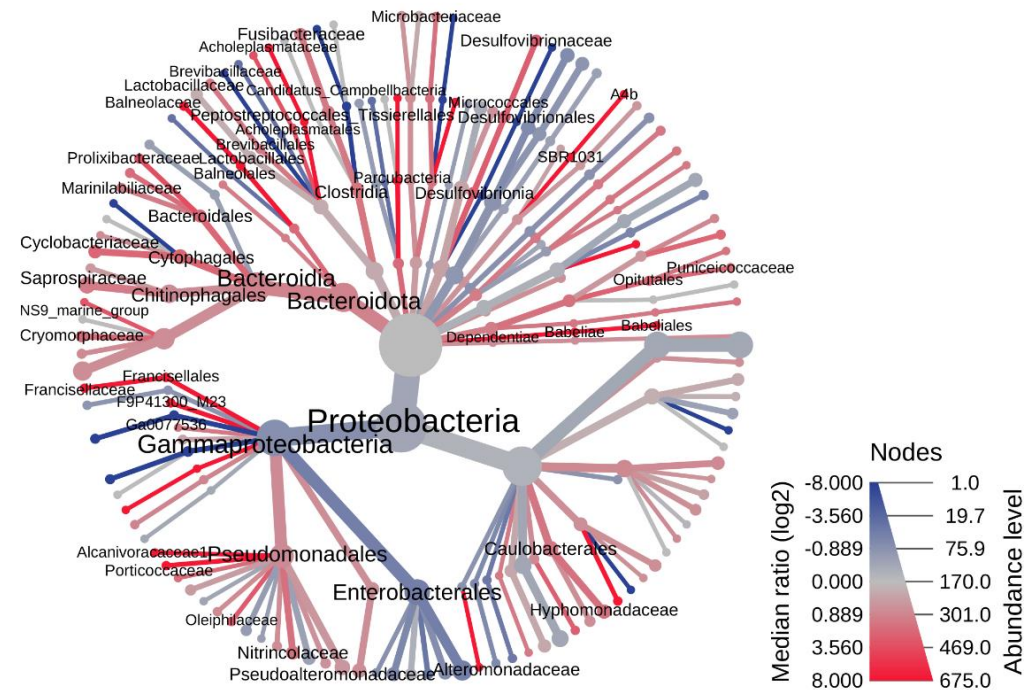
**Figura 6:** Distancia de Bray-Curtis de tanques sanos y afectados con AHPND. Análisis de coordenadas principales (PCoA) bajo diferentes estadios larvarios al nivel de ASV.

El análisis de metagenomeSeq identificó a los géneros *Photobacterium*, *Klebsiella* y *Pontibacterium* como significativamente abundantes en mysis 3 sanas, mientras que *Ligilactobacillus*, *Muricauda* y *Marinibacterium* como significativamente abundantes en mysis 3 afectadas por AHPND. Los géneros *Pontibacterium*, *Maricaulis* y *Aestuariicoccus* fueron significativamente abundantes de postlarvas 4 sanas, mientras que *Leisingera* y *Leifsonia* en postlarvas 4 afectadas por AHPND. Los géneros *Pustulibacterium*, *Mameliella* y *Alteromonas* fueron diferencialmente abundantes en postlarvas 7 sanas, mientras que *Leifsonia* y *Simkania* en postlarvas 7 afectadas por AHPND. Los géneros *Gilvibacter* y *Leisingera* fueron diferencialmente abundantes en postlarvas 10 afectadas por AHPND (Tabla suplementaria X).

La prueba no paramétrica de Wilcoxon generó dos clúster significativos al más alto nivel taxonómico. El Phylum *Proteobacteria* y *Bacteroidota* mostraron la

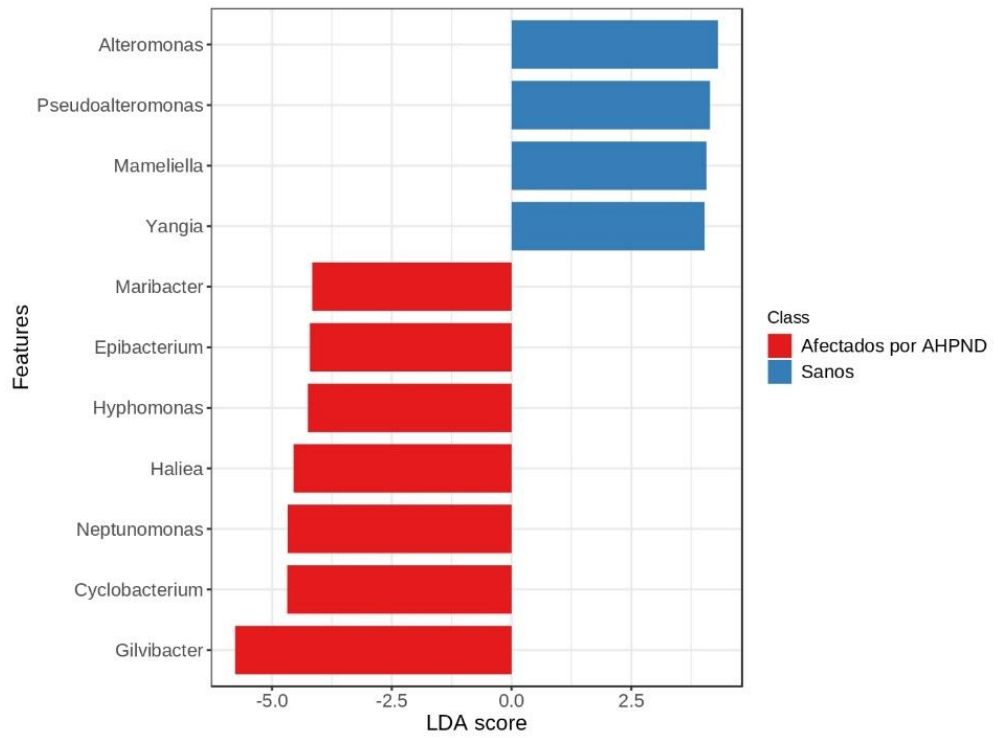


más alta diferencia ( $p < 0.01$ ), seguido de la clase *Gammaproteobacteria* ( $p < 0.01$ ) y la familia *Pseudoalteromonadaceae* ( $p < 0.001$ ). La estructura jerárquica de los niveles taxonómicos puede ser observada en la figura 7.



**Figura 7.** Árbol filogenético de calor a nivel de familia. El color del nodo representa la abundancia de las taxas bacterianas presentes en los tanques sanos y afectados por AHPND.

El análisis discriminante lineal (LDA) con tamaño del efecto (LEfSe) evaluó si las diferencias entre grupos (Kruskall Wallis) y subclases (Prueba no paramétrica de Wilcoxon) fueron significantes. Un total de 22 ASV (Figura suplementaria 12), 6 familias (Figura suplementaria 13), 11 géneros (Figura 8) y 5 especies fueron distinguidos por LEfSe. Los géneros *Alteromonas*, *Mameliella*, *Yangia* y *Pseudoalteromonas* fueron biomarcadores asociados a condiciones saludables, mientras que *Gilvibacter*, *Cyclobacterium*, *Neptunomonas*, *Haliea*, *Epibacterium*, *Maribacter*, *Hyphomonas* fueron biomarcadores asociados a condiciones de AHPND.



**Figura 8.** Análisis discriminante lineal (LDA) con tamaño del efecto (LEfSe,  $p < 0.05$ ,  $LDA \geq 4.0 \leq -4.0$ ). La longitud de la barra representa el tamaño del efecto de los linajes bacterianos a nivel de género para tanques sanos vs afectados por AHPND.

## CAPITULO 4

### 5. DISCUSION

El presente trabajo caracterizó la microbiota de larvas de *P. vannamei* provenientes de tanques afectados por AHPND en condiciones reales de producción comercial. Debido a la alta prevalencia de AHPND en las muestras colectadas, se tomaron muestras suficientes para obtener tanques con estadíos sanos, sin presencia de daños a nivel histológico, ni presencia de genes de toxina pirAB<sup>VP</sup> para objeto de comparación. La prueba PCR detectó la presencia de AHPND en algunos estadíos larvarios que fueron categorizados como sanos por el análisis visual y la prueba histopatológica. Esta particularidad podría ser provocada por la existencia de cepas atípicas portadoras de pirAB<sup>VP</sup>, las cuales requieren de factores desencadenantes adicionales para provocar la enfermedad de AHPND (Aranguren et al., 2020; Cornejo-Granados et al., 2017; Vicente et al., 2020). Por lo tanto, la prueba PCR podría detectar a los genes codificantes de toxinas, pero no determinar la expresión y la presencia de cepas atípicas. En el presente estudio para evitar esta incertidumbre, el análisis de PCR fue complementado con el análisis de histopatología.

La plataforma de secuenciación de alto rendimiento NovaSeq P250 ha sido reportada por otorgar mayor cantidad de taxones a la misma profundidad que la plataforma MiSeq comúnmente usada (Singer et al., 2019). NovaSeq P250 proporcionó datos con valores de calidad superiores al Phred Score 30, bajos porcentajes de error de lecturas, además de costos < 50 % en comparación con la plataforma MiSeq. La región V3-V4 (16S rRNA) fue seleccionada para este estudio debido a que presenta una mayor longitud de tamaño de amplicón, y porque se ha reportado como la más utilizada por otorgar mayor diversidad que las regiones V3 y V4 por separado (Cornejo-Granados et al., 2018; García-López et al., 2020; Holt et al., 2020).

El estudio de las comunidades bacterianas en larvas de *P. vannamei* en condiciones de afectación por AHPND no ha sido descrita hasta la presente fecha. El análisis comparativo demostró abundancias y taxas significativamente distintas entre grupos de tanques con larvas sanas y tanques con larvas enfermas a lo largo de los estadíos de desarrollo. La abundancia a nivel de Phylum fue dominada por *Proteobacteria*, y su presencia ha sido ya reportada durante el desarrollo del camarón (Huang et al, 2016; Zheng et al., 2017). A nivel de Familia, Zheng et al, 2017 describe a *Enterobacteriaceae* como la taxa predominante a lo largo del desarrollo larvario de *P. vannamei*. Este hallazgo

contrasta con el presente estudio, ya que, *Enterobacteriaceae* tuvo una abundancia menor al 1 %. En su lugar, *Rhodobacteraceae* fue la familia dominante y ubicua en todos los estadios de desarrollo, lo que coincide con diversos estudios donde fue dominante y persistente en el tracto digestivo de juveniles y adultos, por lo que podría ser considerada de vital importancia para la búsqueda de probióticos (Huang et al., 2016; Xiong et al., 2017, Xiong et al., 2018). La familia *Flavobacteraceae* ha sido reportada como dominante en el microbioma de camarones en etapas de metamorfosis (estadios previos a postlarva) (Yan et al., 2020), y prevalente en el agua de cultivo desde zoea a estadios iniciales de postlarva (Xue et al., 2020). En el presente estudio, *Flavobacteraceae* dominó en estadios de mysis 3 de tanques afectados por AHPND, y su abundancia relativa decreció hasta llegar a postlarva 10.

El género *Vibrio* tuvo una menor abundancia en larvas enfermas, resultado que coincide con estudios de juveniles y larvas enfermas de Zhang et al, 2014; Zheng et al, 2017 y Wang et al, 2020a. Se ha reportado que *Vibrio* fue abundante en nauplios y no está considerado como biomarcador de enfermedades (Wang et al., 2020a). Con este hecho se podría deducir que *Vibrio* no está relacionado con la emergencia de la enfermedad y que forma parte del medio circundante. *Photobacterium angustum* estuvo enriquecido en camarones juveniles enfermos (Cornejo-Granados et al., 2017). En el presente estudio, *Photobacterium* fue significativamente más abundante en mysis 3 de tanques sanos luego del análisis de metagenomeSeq.

Los índices de diversidad alfa determinaron que no existe diferencia significativa en las muestras a lo largo de los estadios larvarios, hallazgo similar a los encontrados en larvas visualmente enfermas y camarones juveniles afectados por AHPND (Chen et al., 2017; Zheng et al., 2017). Sin embargo, el índice de Shannon determinó menor diversidad en el estadio de mysis 3 de tanques afectados por AHPND. El análisis de diversidad beta determinó que existe diferencia significativa a lo largo de los estadios sanos y afectados por AHPND, sin embargo, no se observó diferencia entre los estadios de postlarva 10, esto podría ser explicado debido a que en esta etapa de desarrollo la microbiota intestinal se vuelve relativamente estable (Yan et al., 2020), el huésped adquiere comunidades para su beneficio (Anghong et al., 2020) y se ha perdido gran parte de la microbiota dérmica (Wang et al., 2020b). Sin embargo, el estadio de mysis 3 (etapa final de metamorfosis), varió significativamente entre condiciones saludables y afectadas por AHPND.

Diversos estudios han reportado la presencia de inconsistencias y falsos positivos en la abundancia diferencial al analizar grandes conjuntos de datos

(Nearing et al., 2021; Wallen, 2021), por lo que, en el presente estudio los *p-value* de LEfSe se corrigieron utilizando el método FDR o FPR. Estos *p-value* corregidos fueron sustituidos por los *p-value* no corregidos que fueron generados por la ejecución LEfSe predeterminada, dándole mayor consistencia biológica al análisis. Los resultados de LEfSe mostraron géneros que fueron catalogados como biomarcadores o indicadores de condiciones saludables, especialmente *Pseudoalteromonas* (LDA >4.0), género reportado por fabricar compuestos antibacterianos extracelulares que muestran actividad antagonista contra Vp AHPND y está relacionada a condiciones de camarones saludables (Louis et al., 2018; H. Wang et al., 2018; Zheng et al., 2016), y *Mameliella*, considerada como un género implicado en la degradación de toxinas y la producción de metabolitos beneficiosos en *P. vannamei* (Duan et al., 2019). En concordancia, los resultados sugieren que estas bacterias podrían disminuir los efectos de AHPND. Se ha reportado que la abundancia del Phylum *Bacteroidota* es está relacionada con larvas saludables (Zheng et al., 2016) y que su abundancia relativa es drásticamente disminuida en condiciones estrés o de enfermedad (Wang et al., 2019; Zhang et al., 2016), esto contrasta con el presente estudio, ya que la abundancia de *Bacteroidota* no fue significativamente diferente entre larvas sanas y enfermas por AHPND. El género *Alteromonas* ha sido reportado como abundante en *Artemia* (Wang et al., 2020a), en nuestro estudio fue considerado un biomarcador asociado a condiciones de salud.

En un análisis de interacción de redes en comunidades microbianas se reportó el amensalismo de *Weissella* contra OTUS de *Vibrio* (Chen et al., 2017), en nuestro estudio *Weissella* fue suplementado como probiótico 4 y mostró baja abundancia y no fue categorizado como biomarcador de salud por LEfSe. Además, los géneros *Pantoea sp*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Candidatus bacilloplasma* que estuvieron relacionadas a la salud en camarones juveniles (Chen et al., 2017; Cornejo-Granados et al., 2017) presentaron muy baja abundancia en este estudio. El género *Leifsonia* ha sido reportado como mayormente abundante en juveniles afectados por AHPND en comparación con juveniles saludables (Hong, Lu, & Xu, 2016). Hecho que coincide con este estudio, donde *Leifsoinia* fue significativamente abundante en postlarva 4 y 7 afectadas por AHPND. El género *Gilvibacter* ha sido reportado como abundante en estadíos tempranos (Wang et al., 2020a), sin embargo, en el presente estudio estuvo abundante en los tanques afectados por AHPND.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente estudio determinó biomarcadores asociados a la salud y AHPND en condiciones reales de producción comercial. Se observó la variabilidad de la microbiota durante los estadios larvarios mediante secuenciación de alto rendimiento HTS. Los análisis para la detección de AHPND pudieron determinar con éxito la presencia de la enfermedad, sin embargo, un análisis histológico acompañado de RT-qPCR podría ser de vital importancia para mejorar el diagnóstico de AHPND y de esta manera evitar falsos positivos a causa de cepas atípicas. LEfSe determinó biomarcadores de salud en *P. vannamei* que tienen relación con la defensa del huésped contra la enfermedad de AHPND. Los resultados demuestran que los géneros *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Mameliella*, *Yangia* y *Pontibacterium* fueron significativamente abundantes en larvas sanas de camarón y podrían ser considerados potenciales probióticos contra AHPND. Sin embargo, para explicar los efectos de estas bacterias, es importante un estudio de los mecanismos involucrados, ya sea como antagonismo o competencia.

Por otro lado, fueron identificados géneros que estuvieron significativamente abundantes en condiciones de enfermedad. Tales géneros podrían ser aislados para determinar la presencia de plásmidos con *pirAB*<sup>VP</sup> y explicar su relación con AHPND. Un estudio enfocado en análisis moleculares de rutas metabólicas y genes funcionales es necesario para obtener mayor entendimiento de la variabilidad y la conexión de la microbiota con el huésped.

Algunos tanques que fueron afectados por AHPND presentaron alta supervivencia y detonan la interrogante ¿Existen biomarcadores asociados a la alta supervivencia?, que puede ser respondida con los protocolos de caracterización aplicados en el presente estudio.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Anghong, P., Uengwetwanit, T., Arayamethakorn, S., Chaitongsakul, P., Karoonuthaisiri, N., & Rungrassamee, W. (2020). Bacterial analysis in the early developmental stages of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61559-1>
- Aranguren, L. F., Mai, H. N., Kanrar, S., Cruz-Flores, R., & Dhar, A. K. (2020). A Mutant of *Vibrio parahaemolyticus* pirABVP (+) That Carries Binary Toxin Genes but Does Not Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 1549, 8(10), 1549. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8101549>
- Balcázar, J. L., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. P. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 147–150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.008>
- BCE, B. C. del E. (2020). Boletín Anuario N°42. Retrieved April 14, 2021, from <https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/327-ver-boletín-anuario-por-años>
- Brummett, R. E., Alvial, A., Kibenge, F., Forster, J., Burgos, J. M., Ibarra, R., Nikuli, H. L. (2014). *Reducing disease risk in aquaculture* (D. C. : W. B. G. Agriculture and environmental services discussion paper ; no. 9 Washington, Ed.). Retrieved from <https://documents.worldbank.org/en/publication/documents-reports/documentdetail/110681468054563438/reducing-disease-risk-in-aquaculture>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., & Wang, H. C. (2017). Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09923-6>
- Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Leonardo-Reza, M., Ochoa-Romo, J. P., & Ochoa-Leyva, A. (2018). A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. *PeerJ*, 2018(8). <https://doi.org/10.7717/peerj.5382>
- Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R.,... Ochoa-Leyva, A. (2017). Microbiome of Pacific White leg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11805-w>
- Dai, W., Sheng, Z., Chen, J., & Xiong, J. (2020). Shrimp disease progression increases the gut bacterial network complexity and abundances of keystone taxa.

- In *Aquaculture* (Vol. 517). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734802>
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Flegel, T. W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002>
- De la Peña, L., Cabillon, N., Catedral, D., Amar, E., Usero, R., Monotilla, W.,... Saloma, C. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms*, 116(3), 251–254. <https://doi.org/10.3354/dao02919>
- Deris, Z. M., Iehata, S., Ikhwanuddin, M., Sahimi, M. B. M. K., Dinh Do, T., Sorgeloos, P., Wong, L. L. (2020). Immune and bacterial toxin genes expression in different giant tiger prawn, *Penaeus monodon* post-larvae stages following AHPND-causing strain of *vibrio parahaemolyticus* challenge. *Aquaculture Reports*, 16, 100248. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100248>
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). *MicrobiomeAnalyst : a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data*. 45(April), 180–188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- Dong, X., Wang, H., Xie, G., Zou, P., Guo, C., Liang, Y., & Huang, J. (2017). An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the *pir<sup>VP</sup>* gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), 1–3. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.131>
- Duan, Y., Wang, Y., Liu, Q., Dong, H., Li, H., Xiong, D., & Zhang, J. (2019). Changes in the intestine microbial, digestion and immunity of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary resistant starch. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42939-8>
- Fan, J., Chen, L., Mai, G., Zhang, H., Yang, J., Deng, D., & Ma, Y. (2019). Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight. *Scientific Reports*, 9(1), 2–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37042-3>
- FAO. (2020, March 30). Farmed shrimp stayed stable in Asia, increased production in Latin America | GLOBEFISH | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved June 10, 2021, from <http://www.fao.org/in-action/globefish/marketreports/resource-detail/es/c/1268642/>
- Gainza, O., Ramírez, C., Ramos, A. S., & Romero, J. (2018). Intestinal Microbiota of White Shrimp *Penaeus vannamei* Under Intensive Cultivation Conditions in Ecuador. *Microbial Ecology*, 75(3), 562–568. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1066-z>
- García-López, F., Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A., Sánchez-López, A., Cota-Huizar, A., RR, S.-M.,... A, O.-L. (2020). Doing More with Less: A Comparison of 16S Hypervariable Regions in Search of Defining the Shrimp Microbiota. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8010134>
- Garibay-Valdez, E., Martínez-Porchas, M., Calderón, K., Vargas-Albores, F., Gollas-



- Galván, T., & Martínez-Córdova, L. (2020). Taxonomic and functional changes in the microbiota of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) associated with postlarval ontogenetic development. *Aquaculture*, *518*, 734842. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734842>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., ... Taberlet, P. (2016, November 1). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, Vol. 7, pp. 1299–1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- García, M. (2003). Análisis del sector camaronero: No 29. Apuntes de Economía. Banco Central del Ecuador.
- Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, *233*(1–4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013>
- Haldar, S., Chatterjee, S., Sugimoto, N., Das, S., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Yamasaki, S. (2011). Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an *Artemia* model. *Microbiology*, *157*(1), 179–188. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041475-0>
- Hameed, A. S. S. (1995). Susceptibility of Three *Penaeus* Species to a *Vibrio campbellii*-like Bacterium. *Journal of the World Aquaculture Society*, *26*(3), 315–319. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1995.tb00260.x>
- Han, J., Tang, K., Tran, L., & Lightner, D. (2015). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, *113*(1), 33–40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>
- Hasan, M. A. R., Siddique, M. A., Hasan, M., Hossain, M. A., & Rahman, M. S. (2017). 16S rRNA gene sequence based identification of *Vibrio* spp. in shrimp and tilapia hatcheries of Bangladesh. *Dhaka University Journal of Biological Sciences*, *26*(1), 45–58. <https://doi.org/10.3329/dujbs.v26i1.46349>
- Holt, C. C., Bass, D., Stentiford, G. D., & van der Giezen, M. (2020). Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107387. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107387>
- Hong, X., Lu, L., & Xu, D. (2016, April 1). Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture International*, Vol. 24, pp. 577–593. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9948-x>
- Huang, F., Pan, L., Song, M., Tian, C., & Gao, S. (2018). Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(19), 8585–8598. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9229-5>
- Huang, Z., Li, X., Wang, L., & Shao, Z. (2016). Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, *47*(6), 1737–1746. <https://doi.org/10.1111/ARE.12628>
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., & Karunasagar, I. (1994). Mass mortality of

- Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3–4), 203–209. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90309-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90309-3)
- Karunasagar, Iddya, Otta, S. K., & Karunasagar, I. (1998). Disease Problems Affecting Cultured Penaeid Shrimp in India. *Fish Pathology*, 33(4), 413–419. <https://doi.org/10.3147/jsfp.33.413>
- Kondo, H., Van, P. T., Dang, L. T., & Hirono, I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announcements*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00978-15>
- Kongrueng, J., Tansila, N., Mitraparp-Arthorn •, P., Nishibuchi, M., Gary, •, Vora, J., Vora, G. (2015). LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Aquaculture International*, 23, 1179–1188. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9874-3>
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.P., Tang, K.F.J., Noble, B.L., Schofield, P., Mohny, L.L., Nunan, L.M., & Navarro, S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology* 110, 174-183.
- Liu, L., Xiao, J., Xia, X., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2015). Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. *Genome Announcements*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01395-15>
- Louis, S., Nelly, W., Dominique, A., Jean-René, M., Marie, P., Cong, Z., ... Dominique, P. (2018). Survival improvement conferred by the *Pseudoalteromonas* sp. NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress. *Aquaculture*, 495, 888–898. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.06.058>
- Md Zoqratt, M. Z. H., Eng, W. W. H., Thai, B. T., Austin, C. M., & Gan, H. M. (2018). Microbiome analysis of Pacific white shrimp gut and rearing water from Malaysia and Vietnam: implications for aquaculture research and management. *PeerJ*, 6, e5826. <https://doi.org/10.7717/peerj.5826>
- Mirbakhsh, M., Akhavan; Afsharnasab, Khanafari, & Razavi, (2014). Molecular Identification of *Vibrio harveyi* From Larval Stage of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Boone (Crustacea: Decapoda) By Polymerase Chain Reaction and 16S rDNA Sequencing. In *Iranian Journal of Fisheries Sciences* (Vol. 13). Retrieved from Iranian Journal of Fisheries Sciences website: <http://jifro.ir/article-1-1509-en.html>
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M., MacDonald, J., Desai, D., Allward, N., Langille, M. G. I. (2021). Microbiome differential abundance methods produce disturbingly different results across 38 datasets. *BioRxiv*, 2021.05.10.443486. <https://doi.org/10.1101/2021.05.10.443486>
- Paulson, J. N., Stine, O. C., Bravo, H. C., & Pop, M. (2013). Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nature Methods* 2013 10:12, 10(12), 1200–1202. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>
- Peña-Navarro, N., Castro-Vásquez, R., Vargas-Leitón, B., & Dolz, G. (2020).

- Molecular detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* shrimps in Costa Rica. *Aquaculture*, 523, 735190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735190>
- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaan, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Reyes Muñoz, A. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis* clade. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30903-x>
- Restrepo, L., Bayot, B., Betancourt, I., & Pinzón, A. (2016). Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. *Genomics Data*, 9, 143–144. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.08.008>
- Rizan, N., Yew, C. Y., Niknam, M. R., Krishnasamy, J., Bhassu, S., Hong, G. Z., Periasamy, V. (2018). Electronic Properties of Synthetic Shrimp Pathogens-derived DNA Schottky Diodes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18825-6>
- Robertson, P., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J., Zherdmant, M., & Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(2), 151–155. <https://doi.org/10.3354/dao032151>
- Santos, H. M., Tsai, C. Y., Maquiling, K. R. A., Tayo, L. L., Mariatulqabtiah, A. R., Lee, C. W., & Chuang, K. P. (2020, February 1). Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. *Aquaculture International*, Vol. 28, pp. 169–185. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00451-w>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Singer, G. A. C., Fahner, N. A., Barnes, J. G., McCarthy, A., & Hajibabaei, M. (2019). Comprehensive biodiversity analysis via ultra-deep patterned flow cell technology: a case study of eDNA metabarcoding seawater. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42455-9>
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, 10(5), e0126987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>
- Soto-Rodríguez, S. A., Simoes, N., Roque, A., & Gómez Gil, B. (2006). Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*, 258(1–4), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.035>
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLOS*

- ONE*, 14(1), e0210478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Sritunyalucksana, K., Dangtip, S., Sanguanrut, P., Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Thitamadee, S., Flegel, T. W. (2015). *A two-tube, nested PCR detection method for AHPND bacteria*.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., Itsathitphaisarn, O. (2016, February 1). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, Vol. 452, pp. 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohney, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Tzuc, J. T., Escalante, D. R., Rojas Herrera, R., Gaxiola Cortés, G., & Ortiz, M. L. A. (2014). Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: Digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-280>
- Vandenbergh, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. S., & Swings, J. (1998). Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 169(1–2), 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00319-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00319-6)
- Vandenbergh, Johan, Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Swings, J. (1999). Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2592–2597. <https://doi.org/10.1128/aem.65.6.2592-2597.1999>
- Vicente, A., Taengphu, S., Hung, A. L., Mora, C. M., Dong, H. T., & Senapin, S. (2020). Detection of *Vibrio campbellii* and *V. parahaemolyticus* carrying full-length pirABVp but only *V. campbellii* produces PirVp toxins. *Aquaculture*, 519, 734708. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734708>
- Wallen, Z. D. (2021). Comparison study of differential abundance testing methods using two large Parkinson disease gut microbiome datasets derived from 16S amplicon sequencing. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04193-6>
- Wang, H., Huang, J., Wang, P., & Li, T. (2020a). *Insights into the microbiota of larval and postlarval Pacific white shrimp (Penaeus vannamei) along early developmental stages: a case in pond level*. 295, 1517–1528. <https://doi.org/10.1007/s00438-020-01717-2>
- Wang, H., Wang, C., Tang, Y., Sun, B., Huang, J., & Song, X. (2018). Pseudoalteromonas probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 494, 30–36. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.05.020>
- Wang, J., Huang, Y., Xu, K., Zhang, X., Sun, H., Fan, L., & Yan, M. (2019). White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota

- composition and function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 130–137. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.09.076>
- Wang, Y., Wang, K., Huang, L., Dong, P., Wang, S., Chen, H., ... Zhang, D. (2020b). Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome* 2020 8:1, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00879-W>
- World Organization for Animal Health (OIE). (2003). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (Fourth). Paris: Office International des épizooties.
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., ... Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep42177>
- Xiong, J., Dai, W., Qiu, Q., Zhu, J., Yang, W., & Li, C. (2018). Response of host–bacterial colonization in shrimp to developmental stage, environment and disease. *Molecular Ecology*, 27(18), 3686–3699. <https://doi.org/10.1111/mec.14822>
- Xiong, J., Zhu, J., Dai, W., Dong, C., Qiu, Q., & Li, C. (2017). Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. *Environmental Microbiology*, 19(4), 1490–1501. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13701>
- Xue, M., He, Y., Chen, D., Wang, L., Liang, H., Liu, J., & Wen, C. Q. (2020). Temporal dynamics of aquatic microbiota and their correlation with environmental factors during larviculture of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735605.
- Xue, M., He, Y., Chen, D., Wang, L., Liang, H., Liu, J., & Wen, C. Q. (2020). Temporal dynamics of aquatic microbiota and their correlation with environmental factors during larviculture of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529, 735605.
- Yan, M., Zhang, X., Hu, L., Huang, X., Zhou, Q., Zeng, G., ... & Chen, J. (2020). Bacterial community dynamics during nursery rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) revealed via high-throughput sequencing. *Indian journal of microbiology*, 60(2), 214–221.
- Yang. (2020). *microbiomeMarker: microbiome biomarker analysis. R package version 0.0.1.9000*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3749415>
- Yu, H., Yang, X., Zhang, J., Yang, H., Zhao, P., Shen, H., ... Gao, S. (2021). A rapid real-time recombinase polymerase amplification assay for diagnosis of acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 53(3), 381–384. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa175>
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., & He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, 2017(11). <https://doi.org/10.7717/peerj.3986>
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., ... Li, E. (2014).

- Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 434, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.008>
- Zhang, D., Wang, X., Xiong, J., Zhu, J., Wang, Y., Zhao, Q., ... & Dai, H. (2014). Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status. *Ecological indicators*, 38, 218-224.
- Zhang, M., Sun, Y., Liu, Y., Qiao, F., Chen, L., Liu, W. T., ... Li, E. (2016). Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. *Aquaculture*, 454, 72–80. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2015.12.014>
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, J., Qiao, Y., Wang, L., Li, Z., ... Yu, M. (2017). Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01362>
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., & Zhang, X. H. (2016). Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture*, 451, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.020>
- Zorriehzaha, M. J., & Banaederakhshan, R. (2015). Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2s), 64–72 | [10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64.72](https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64.72). Retrieved July 13, 2020, from <https://sci-hub.tw/http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64.72>

## **8. ANEXOS**

### **Anexo 1. Tablas Suplementarias**

**Tabla Suplementaria I.** Esquema del muestreo de larvas de camarón *Penaeus vannamei* realizado entre 29 de enero y 5 de marzo de 2021 en 64 tanques distribuidos en seis módulos (A, B, C, D, E y F) de un laboratorio de larvas comercial de la zona de Mar Bravo (Santa Elena, Ecuador), para un total de 246 muestras de larvas de camarón. \* El origen del nauplio fue el mismo para la siembra de los tanques de los módulos A y B. \*\* No se colectó muestras de todos los tanques del correspondiente módulo porque en el día señalado murió el 100% de la población de los tanques afectados.

Fecha de muestreo	Módulo A (10 tanques)		Módulo B (10 tanques)		Módulo C (12 tanques)		Módulo D (12 tanques)		Módulo E (10 tanques)		Módulo F (10 tanques)		No. muestras colectadas por día
	Estadio de la larva	Cantidad de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	
29/01/21	Nauplio 5	1*	Nauplio 5	*									1
30/01/21	Zoea 1		Zoea 1										0
31/01/21	Zoea 2		Zoea 2										0
01/02/21	Zoea 3		Zoea 3										0
02/02/21	Mysis 1		Mysis 1										0
03/02/21	Mysis 2		Mysis 2										0
04/02/21	Mysis 3	10	Mysis 3	10	Nauplio 5	1							21
05/02/21	Postlarva 1		Postlarva 1		Zoea 1								0
06/02/21	Postlarva 2		Postlarva 2		Zoea 2								0
07/02/21	Postlarva 3		Postlarva 3		Zoea 3								0
08/02/21	Postlarva 4	10	Postlarva 4	10	Mysis 1								20
09/02/21	Postlarva 5		Postlarva 5		Mysis 2		Nauplio 5	1					1
10/02/21	Postlarva 6		Postlarva 6		Mysis 3	12	Zoea 1						12
11/02/21	Postlarva 7	10	Postlarva 7	10	Postlarva 1		Zoea 2						20
12/02/21	Postlarva 8		Postlarva 8		Postlarva 2		Zoea 3						0
13/02/21	Postlarva 9		Postlarva 9		Postlarva 3		Mysis 1						0



Fecha de muestreo	Módulo A (10 tanques)		Módulo B (10 tanques)		Módulo C (12 tanques)		Módulo D (12 tanques)		Módulo E (10 tanques)		Módulo F (10 tanques)		No. muestras colectadas por día
	Estadio de la larva	Cantidad de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	
14/02/21	Postlarva 10	10	Postlarva 10	7**	Postlarva 4	12	Mysis 2						29
15/02/21					Postlarva 5		Mysis 3	12					12
16/02/21					Postlarva 6		Postlarva 1		Nauplio 5				0
17/02/21					Postlarva 7	12	Postlarva 2		Zoea 1		Nauplio 5		12
18/02/21					Postlarva 8		Postlarva 3		Zoea 2		Zoea 1		0
19/02/21					Postlarva 9		Postlarva 4	12	Zoea 3		Zoea 2		12
20/02/21					Postlarva 10	12	Postlarva 5		Mysis 1		Zoea 3	10	22
21/02/21							Postlarva 6		Mysis 2		Mysis 1		0
22/02/21							Postlarva 7	6**	Mysis 3	10	Mysis 2		16
23/02/21							Postlarva 8		Postlarva 1		Mysis 3		0
24/02/21							Postlarva 9		Postlarva 2		Postlarva 1	10	10
25/02/21							Postlarva 10	0**	Postlarva 3		Postlarva 2		0
26/02/21									Postlarva 4	10	Postlarva 3		10
27/02/21									Postlarva 5		Postlarva 4	10	10
28/02/21									Postlarva 6		Postlarva 5		0
01/03/21									Postlarva 7	8**	Postlarva 6		8
02/03/21									Postlarva 8		Postlarva 7	10	10
03/03/21									Postlarva 9		Postlarva 8		0
04/03/21									Postlarva 10	8**	Postlarva 9		8

Fecha de muestreo	Módulo A (10 tanques)		Módulo B (10 tanques)		Módulo C (12 tanques)		Módulo D (12 tanques)		Módulo E (10 tanques)		Módulo F (10 tanques)		No. muestras colectadas por día
	Estadio de la larva	Cantidad de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	Estadio de la larva	Número de tanque muestreados	
05/03/21									Postlarva 11	6***	Postlarva 10	6**	12
No. de muestras colectadas por módulo	41		37		49		31		42		46		246

**Tabla Suplementaria II.** Iniciadores y condiciones de amplificación utilizados para la detección de los genes PirA y PirB causantes de AHPND.

Nombre del iniciador	Secuencia 5' - 3'	Condiciones de amplificación			Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
		Inicial	Amplificación	Final		
<b>AP4 (Primer paso)</b>	AP4-F1	ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC	94 °C, 2 min	30 ciclos: 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 90 s	72 °C por 2 min	1269 (Dangtip et al., 2015)
	AP4-R1	ACGATTTTCGACGTTCCCAA				
<b>AP4 (Segundo paso)</b>	AP4-F2	TTGAGAATACGGGACGTGGG	94 °C, 2 min	20 ciclos: 94 °C por 20 s, 55 °C por 20 s, 72 °C por 20 s	72 °C por 2 min	230
	AP4-R2	GTTAGTCATGTGAGCACCTTC				
<b>VpirA</b>	VpirA-284F	TGACTATTCTCACGATTGGACTG	94 °C, 3 min	35 ciclos: 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 30 s	72 °C por 7 min	284 (Han et al., 2015a)
	VpirA-284R	CACGACTAGCGCCATTGTTA				
<b>VpirB</b>	VpirB-392F	TGATGAAGTGATGGGTGCTC	94 °C, 3 min	35 ciclos: 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 30 s	72 °C por 7 min	392
	VpirB-392R	TGTAAGCGCCGTTTAACTCA				

**Tabla Suplementaria III.** Lectura de calidad y concentración del gDNA extraído con ZymoBionics DNA Microprep Kit en un espectrofotómetro micro UV-Vis A260/A280 de barrido espectral NanoDrop One (Thermo Scientific, EEUU).

Tanque	Estadío	Módulo	Concentración	A260/280
-	Nauplio	Módulo A y B	20,7	1,84
<b>TQ 7</b>	Mysis 3	Módulo A	42,8	1,87
<b>TQ 7</b>	PL 4	Módulo A	54,9	1,89
<b>TQ 7</b>	PL 7	Módulo A	20	1,77
<b>TQ 7</b>	PL10	Módulo A	20	1,64
<b>TQ 9</b>	Mysis 3	Módulo A	32,5	1,8
<b>TQ 9</b>	PL 4	Módulo A	22,2	1,77
<b>TQ 9</b>	PL 7	Módulo A	44,4	1,85
<b>TQ 9</b>	PL10	Módulo A	29,2	1,85
<b>TQ 10</b>	Mysis 3	Módulo A	29,1	1,82
<b>TQ 10</b>	PL 4	Módulo A	39,4	1,83
<b>TQ 10</b>	PL 7	Módulo A	20	2,1
<b>TQ 10</b>	PL10	Módulo A	29,7	1,83
<b>TQ 2</b>	Mysis 3	Módulo A	21,2	1,8
<b>TQ 2</b>	PL 4	Módulo A	23,4	1,91
<b>TQ 2</b>	PL 7	Módulo A	29,5	1,92
<b>TQ 2</b>	PL10	Módulo A	46,6	1,89
<b>TQ 6</b>	Mysis 1	Módulo E	27,7	1,85
<b>TQ 6</b>	PL2	Módulo E	79,3	1,84
<b>TQ 6</b>	PL5	Módulo E	58,5	1,86
<b>TQ 6</b>	PL8	Módulo E	81,5	1,86
<b>TQ 6</b>	PL11	Módulo E	33,9	1,87
<b>TQ 7</b>	Mysis 1	Módulo E	35,1	1,93
<b>TQ 7</b>	PL2	Módulo E	27	1,9
<b>TQ 7</b>	PL5	Módulo E	20	1,8
<b>TQ 7</b>	PL8	Módulo E	56,6	1,89
<b>TQ 7</b>	PL11	Módulo E	40,4	1,87
<b>TQ 8</b>	Zoea 3	Módulo F	21,7	1,93
<b>TQ 8</b>	PL1	Módulo F	28,8	1,88
<b>TQ 8</b>	PL4	Módulo F	20	1,86
<b>TQ 8</b>	PL7	Módulo F	27,5	1,89
-	Nauplio	Módulo C	76,8	1,87
<b>TQ 1</b>	Mysis 3	Módulo C	29,6	1,8
<b>TQ 1</b>	PL4	Módulo C	21,5	1,93

<b>TQ 1</b>	PL7	Módulo C	29,5	1,87
<b>TQ 1</b>	PL10	Módulo C	39,9	1,93
-	Nauplio	Módulo D	27	1,85
-	Nauplio	Módulo D	32,4	1,81
-	Nauplio	Módulo D	60,8	1,86
<b>TQ 2</b>	Mysis 3	Módulo D	31,9	1,81
<b>TQ 2</b>	PL4	Módulo D	46,9	1,81
<b>TQ 2</b>	PL7	Módulo D	71,4	1,87
<b>TQ 4</b>	Mysis 3	Módulo D	41,1	1,85
<b>TQ 4</b>	PL4	Módulo D	65,5	1,66
<b>TQ 4</b>	PL7	Módulo D	50,2	1,78
<b>TQ 3</b>	Mysis 3	Módulo B	53,4	1,84
<b>TQ 3</b>	PL4	Módulo B	68	1,62
<b>TQ 3</b>	PL7	Módulo B	38,6	1,37
<b>TQ 3</b>	PL10	Módulo B	49,9	1,81
<b>TQ 4</b>	Mysis 3	Módulo B	122	1,96
<b>TQ 4</b>	PL 4	Módulo B	37,2	1,82
<b>TQ 4</b>	PL 7	Módulo B	52,6	1,85
<b>TQ 4</b>	PL10	Módulo B	49,8	1,8
<b>TQ 5</b>	Mysis 3	Módulo B	53,1	1,85
<b>TQ 5</b>	PL 4	Módulo B	123,1	1,88
<b>TQ 5</b>	PL 7	Módulo B	153,9	1,88
<b>TQ 5</b>	PL10	Módulo B	65,5	1,87
<b>TQ 8</b>	Mysis 3	Módulo B	33,8	1,86
<b>TQ 8</b>	PL 4	Módulo B	40,2	1,83
<b>TQ 8</b>	PL 7	Módulo B	104,3	1,89
<b>TQ 8</b>	PL10	Módulo B	22,3	1,83
<b>TQ 10</b>	Mysis 1	Módulo E	65,2	1,89
<b>TQ 10</b>	PL2	Módulo E	47,2	1,87
<b>TQ 10</b>	PL5	Módulo E	41,4	1,93
<b>TQ 10</b>	PL8	Módulo E	29,3	1,95
<b>TQ 10</b>	Mysis 1	Módulo E	66	1,87
<b>TQ 10</b>	PL2	Módulo E	54,9	1,85
<b>TQ 10</b>	PL5	Módulo E	24,7	1,88
<b>TQ 10</b>	PL8	Módulo E	24	1,79
<b>TQ 10</b>	Mysis 1	Módulo E	83,9	1,95
<b>TQ 10</b>	PL2	Módulo E	70,1	1,88
<b>TQ 10</b>	PL5	Módulo E	23,9	1,88

<b>TQ 10</b>	PL8	Módulo E	29,3	1,88
<b>TQ 5</b>	Mysis 3	Módulo A	75,2	2,1
<b>TQ 5</b>	PL 4	Módulo A	47,5	2,03
<b>TQ 5</b>	PL 7	Módulo A	26	1,91
<b>TQ 5</b>	PL10	Módulo A	21,2	1,88
<b>TQ 8</b>	Mysis 3	Módulo A	31,9	2,01
<b>TQ 8</b>	PL 4	Módulo A	29,3	1,8
<b>TQ 8</b>	PL 7	Módulo A	37,9	1,82
<b>TQ 8</b>	PL10	Módulo A	31,5	1,79
<b>TQ 9</b>	Mysis 1	Módulo E	28,7	1,95
<b>TQ 9</b>	PL2	Módulo E	24,1	1,87
<b>TQ 9</b>	PL5	Módulo E	37,8	1,93
<b>TQ 9</b>	PL8	Módulo E	62	1,85
<b>TQ 1</b>	Mysis 3	Módulo B	25,2	1,8
<b>TQ 1</b>	PL 4	Módulo B	49,1	1,96
<b>TQ 1</b>	PL 7	Módulo B	21,3	1,8
<b>TQ 10</b>	Zoea 3	Módulo F	39,6	1,78
<b>TQ 10</b>	PL1	Módulo F	20	1,85
<b>TQ 10</b>	PL4	Módulo F	22,4	1,73
<b>TQ 10</b>	PL7	Módulo F	45,1	1,89
<b>TQ 10</b>	PL10	Módulo F	55,8	1,91
<b>Probiótico</b>		MC	25	1,8
<b>Probiótico</b>		EP	20,3	1,86
<b>Probiótico</b>		EMO	33,1	2
<b>Probiótico</b>		AP	47	1,95
	<b>Alimento</b>		20	1,74

**Tabla Suplementaria IV.** Resultados del análisis de PCR para la detección de los genes de toxinas PirA y PirB en muestras de larvas *P. vannamei* de un laboratorio comercial de la zona de Mar Bravo (Santa Elena, Ecuador). Se muestran los resultados positivos a AHPND (+) y negativos a AHPND (-) del análisis de PCR. M: El 100% de la población del tanque murió cuando las larvas estuvieron en el correspondiente estadio.

Módulo	Tanque	Estadio de la larva y genes amplificados															
		Nauplio			Mysis 3			PL4			PL7			PL10			
		PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	
<b>A</b>	1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	M	M	M	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
<b>C</b>	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	
	3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
	4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	
	5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
	7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	

Estadío de la larva y genes amplificados															
	Nauplio			Mysis 3			PL4			PL7			PL10		
8	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
11	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+

Estadío de la larva y genes amplificados																
Módulo	Tanque	Nauplio			Mysis 3			PL4			PL7			PL10		
		PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4
<b>D</b>	1	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	M	M	M
	2	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	M	M	M
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	M	M	M	M	M	M
	4	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	M	M	M
	5	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	M	M	M
	6	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	M	M	M
	7	-	-	-	+	-	-	+	+	+	M	M	M	M	M	M
	8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	M	M	M	M	M
	9				+	-	-	+	+	+	M	M	M	M	M	M
	10				+	-	-	+	+	+	M	M	M	M	M	M
	11				+	-	-	+	-	+	-	+	+	M	M	M
	12				+	+	-	+	-	-	M	M	M	M	M	M

Estadío de la larva y genes amplificados																
Módulo	Tanque	Mysis 3			PL4			PL7			PL10			PL11		
		PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4
<b>E</b>	1	+	-	+	+	-	-	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
	3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
	4	+	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M	M	M	M	M



Estadío de la larva y genes amplificados																
		Mysis 3			PL4			PL7			PL10			PL11		
	5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	6	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	7	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	8	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	M	M	M
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M

Estadío de la larva y genes amplificados																
		Zoea 3			PL1			PL4			PL7			PL10		
Módulo	Tanque	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4	PirA	PirB	AP4
F	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	3	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
	4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+		M	
	5	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	6	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+		M	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+		M	
	8	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+		M	
	9	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla Suplementaria V.** Porcentaje de supervivencia de los 64 tanques que fueron muestreados en un laboratorio comercial de la zona de Mar Bravo, Santa Elena.

Módulo	Tanque	Supervivencia a la cosecha (%)
<b>A</b>	1	<25
	2	61
	3	<25
	4	<25
	5	47,5
	6	<25
	7	71,2
	8	<25
	9	83,54
	10	61,6
<b>B</b>	1	0
	2	<25
	3	<25
	4	<25
	5	<25
	6	0
	7	0
	8	<25
	9	<25
	10	<25
<b>C</b>	1	<25
	2	<25
	3	<25
	4	<25
	5	<25
	6	<25
	7	<25
	8	<25
	9	<25
	10	<25
	11	<25
	12	<25
<b>D</b>	1	0

	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
	6	0
	7	0
	8	0
	9	0
	10	0
	11	0
	12	0
<b>E</b>	1	0
	2	<25
	3	<25
	4	0
	5	<25
	6	68,43
	7	68.1
	8	<25
	9	39,2
	10	56,66
<b>F</b>	1	<25
	2	<25
	3	<25
	4	0
	5	<25
	6	0
	7	0
	8	0
	9	50
	10	<25

**Tabla Suplementaria VI.** Resultados del análisis de histopatología para un grupo seleccionado de larvas. Se muestra la prevalencia (número de larvas afectadas por AHPND/número de larvas analizadas por histopatología).

Módulo	Tanque	Estadio del camarón	Porcentaje (%) de larvas positivas a AHPND según histopatología
<b>C</b>	1	PL 10	31,3
<b>D</b>	2	PL 7	76,5
<b>A</b>	5	PL 10	0,0
	7	PL 10	100,0
	9	PL 10	63,2
	10	PL 10	26,7
	1	PL 10	13,3
	4	PL 10	37,5
	2	PL 10	68,42
<b>B</b>	3	PL 10	85,0
	5	PL 10	88,9
	8	PL 10	94,4
	1	PL 7	0,0
	4	PL 10	53,3
<b>E</b>	6	PL 11	0,0
	7	PL 11	0,0
	9	PL 10	0,0
	10	PL 10	0,0
<b>F</b>	8	PL 7	0,0
	10	PL 7	0,0

**Tabla VII.** Severidad de signos externos de enfermedad (comportamiento de nado errático, tracto digestivo vacío, baja actividad de la larva y coloración blanquecina) en los tanques de los seis módulos muestreados. Valores iguales a 1, 2, 3 y 4 corresponden a severidades valoradas como leve, media, severa y muy severa, respectivamente.

Módulo	Severidad de los signos externos de enfermedad
<b>A y F</b>	1
<b>E</b>	2
<b>B</b>	3
<b>C y D</b>	4

**Tabla Suplementaria VIII.** Larvas de diversos estadios y módulos secuenciadas por Illumina NovaSeq P250.

<b>(+) AHPND</b>				
<b>N° Tubo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Tanque</b>	<b>Estadio</b>	<b>Módulo</b>
<b>L50</b>	Larvas	3	Mysis 3	Mod -B
<b>L51</b>	Larvas	3	PL4	
<b>L52</b>	Larvas	3	PL7	
<b>L53</b>	Larvas	3	PL10	
<b>L54</b>	Larvas	4	Mysis 3	
<b>L55</b>	Larvas	4	PL 4	
<b>L56</b>	Larvas	4	PL 7	
<b>L57</b>	Larvas	4	PL10	
<b>L58</b>	Larvas	5	Mysis 3	
<b>L59</b>	Larvas	5	PL 4	
<b>L60</b>	Larvas	5	PL 7	
<b>L61</b>	Larvas	5	PL10	
<b>(-) AHPND</b>				
<b>N° Tubo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Tanque</b>	<b>Estadio</b>	<b>Módulo</b>
<b>L66</b>	Larvas	10	Mysis 3	Mod-E
<b>L67</b>	Larvas	10	PL 4	
<b>L68</b>	Larvas	10	PL 7	
<b>L69</b>	Larvas	10	PL10	
<b>L70</b>	Larvas	10	Mysis 3	
<b>L71</b>	Larvas	10	PL 4	
<b>L72</b>	Larvas	10	PL 7	
<b>L73</b>	Larvas	10	PL10	
<b>L74</b>	Larvas	10	Mysis 3	
<b>L75</b>	Larvas	10	PL 4	
<b>L76</b>	Larvas	10	PL 7	
<b>L77</b>	Larvas	10	PL10	
<b>Probiótico 1</b>				
<b>Probiótico 2</b>				
<b>Probiótico 3</b>				
<b>Probiótico 4</b>				
<b>Alimento comercial</b>				

**Tabla Suplementaria IX.** Calidad y número de secuencias obtenidas de las muestras secuenciadas.

<b>Muestra</b>	<b>Lecturas sin procesar</b>	<b>Lecturas limpias</b>	<b>Base cruda (G)</b>	<b>Base limpia (G)</b>	<b>Tasa de error (%)</b>	<b>Q20 (%)</b>	<b>Q30 (%)</b>	<b>Contenido de GC (%)</b>
<b>L50</b>	141997	141911	0,07	0,07	0,03	94,54	87,88	52,16
<b>L51</b>	143582	143408	0,07	0,07	0,03	94,68	88,08	53,06
<b>L52</b>	153503	153395	0,08	0,08	0,03	94,72	88,12	52,97
<b>L53</b>	167300	167189	0,08	0,08	0,03	94,6	87,89	53,30
<b>L54</b>	134260	134186	0,07	0,07	0,03	94,47	87,65	51,8
<b>L55</b>	157303	157179	0,08	0,08	0,03	94,76	88,17	53,35
<b>L56</b>	139372	139258	0,07	0,07	0,03	94,7	88,04	54
<b>L57</b>	133359	133245	0,07	0,07	0,03	94,68	88,1	53,81
<b>L58</b>	140700	140622	0,07	0,07	0,03	94,33	87,4	51,42
<b>L59</b>	147094	146989	0,07	0,07	0,03	94,67	88,02	52,52
<b>L60</b>	130847	130641	0,07	0,07	0,03	94,93	88,55	53,64
<b>L61</b>	140064	139971	0,07	0,07	0,03	94,91	88,48	53,56
<b>L62</b>	138149	138007	0,07	0,07	0,03	94,8	88,36	53,25
<b>L63</b>	136846	136720	0,07	0,07	0,03	94,84	88,44	52,76
<b>L64</b>	134488	134369	0,07	0,07	0,03	94,87	88,46	53,13
<b>L65</b>	140069	139961	0,07	0,07	0,03	94,86	88,37	53,57
<b>L66</b>	140431	140344	0,07	0,07	0,03	94,96	88,63	53,67
<b>L67</b>	135223	135116	0,07	0,07	0,03	94,91	88,49	53,54
<b>L68</b>	138797	138704	0,07	0,07	0,03	94,94	88,57	53,11
<b>L69</b>	141986	141895	0,07	0,07	0,04	94,16	85,38	53,01

<b>Muestra</b>	<b>Lecturas sin procesar</b>	<b>Lecturas limpias</b>	<b>Base cruda (G)</b>	<b>Base limpia (G)</b>	<b>Tasa de error (%)</b>	<b>Q20 (%)</b>	<b>Q30 (%)</b>	<b>Contenido de GC (%)</b>
<b>L70</b>	168922	168831	0,08	0,08	0,03	94,91	88,47	53,54
<b>L71</b>	164522	164378	0,08	0,08	0,03	94,92	88,52	53,31
<b>L72</b>	143026	142897	0,07	0,07	0,03	94,81	88,35	52,96
<b>L73</b>	158397	158249	0,08	0,08	0,03	94,74	88,18	53,13
<b>L74</b>	161192	159871	0,08	0,08	0,04	93,20	84,80	53,83
<b>L75</b>	132835	132629	0,07	0,07	0,03	94,79	88,38	53,17
<b>L76</b>	161900	161793	0,08	0,08	0,03	94,77	88,26	52,87
<b>L77</b>	158143	158028	0,08	0,08	0,03	94,7	88,11	52,87
<b>L98</b>	167980	167789	0,08	0,08	0,03	94,45	87,37	53,23
<b>L99</b>	151337	151283	0,08	0,08	0,04	93,11	84,86	54,23
<b>L100</b>	149501	149197	0,07	0,07	0,04	94,02	86,64	52,51
<b>L101</b>	158598	158545	0,08	0,08	0,03	95,37	89,15	52,14
<b>L102</b>	154723	154625	0,08	0,08	0,03	95,36	89,06	53,74

**Tabla Suplementaria X.** Géneros diferencialmente abundantes en los estadios de tanques sanos y afectados por AHPND que fueron identificados por MetagenomeSeq (adj. p-value < 0.01).

<b>Estadio</b>	<b>Condición</b>	<b>Género</b>	<b>P-value</b>	<b>FDR</b>
<b>Mysis 3</b>	Sanos	<i>Photobacterium</i>	1.39E-5	0.002
	Sanos	<i>Klebsiella</i>	1.17E-4	0.006
	Sanos	<i>Pontibacterium</i>	1.63E-4	0.006
	Enfermos	<i>Ligilactobacillus</i>	2.33E-5	0.002
	Enfermos	<i>Muricauda</i>	1.39E-4	0.006
	Enfermos	<i>Marinibacterium</i>	2.34E-4	0.007
<b>Postlarvas 4</b>	Sanos	<i>Pontibacterium</i>	8.26E-5	0.004
	Sanos	<i>Maricaulis</i>	1.65E-4	0.007
	Sanos	<i>Aestuariicoccus</i>	2.24E-4	0.008
	Enfermos	<i>Leisingera</i>	1.02E-6	1.12E-4
	Enfermos	<i>Leifsonia</i>	5.71E-5	0.004
<b>Postlarvas 7</b>	Sanos	<i>Pustulibacterium</i>	3.39E-5	0.004
	Sanos	<i>Alteromonas</i>	1.55E-4	0.008
	Enfermos	<i>Leifsonia</i>	3.68E-5	0.004
	Enfermos	<i>Simkania</i>	1.43E-4	0.008
<b>Postlarvas 10</b>	Enfermos	<i>Gilvibacter</i>	5.92E-4	7.86E-08
	Enfermos	<i>Leisingera</i>	6.13E-4	8.96E-08



**Tabla Suplementaria XI.** Asignación taxonómica para los ASV diferencialmente abundante en tanques sanos y afectados por AHPND.

<b>Taxonomía</b>	<b>Filo</b>	<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>
ASV_7	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Gilvibacter</i>	-
ASV_12	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	-	-
ASV_19	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Yangia</i>	-
ASV_24	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Cyclobacteriaceae</i>	<i>Cyclobacterium</i>	<i>C. marinum</i>
ASV_42	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Mameliella</i>	<i>M. alba</i>
ASV_47	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	-	-	-
ASV_49	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Alteromonas</i>	-
ASV_50	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	-	-
ASV_51	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	-	-
ASV_60	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	-	-
ASV_62	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Haliaceae</i>	<i>Haliea</i>	-
ASV_64	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	-	-
ASV_85	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	-	-
ASV_88	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Epibacterium</i>	<i>E. mobile</i>
ASV_90	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	-
ASV_92	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	-	-
ASV_93	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	<i>Neptunomonas</i>	-
ASV_131	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	-	-
ASV_157	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Hyphomonas</i>	-
ASV_185	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Maribacter</i>	<i>M. flavus</i>

<b>Taxonomía</b>	<b>Filo</b>	<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>
<b>ASV_195</b>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rickettsiales</i>	-	-	-
<b>ASV_270</b>	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	-	-

**Anexo 2.** Figuras Suplementarias



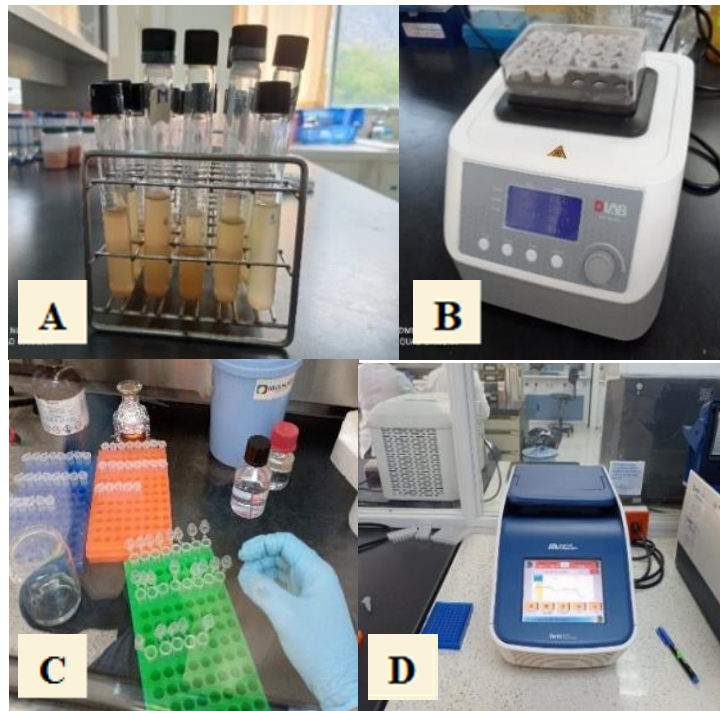
**Figura Suplementaria 1.** Muestreo de larvas de camarón *P. vannamei* en 64 tanques de un laboratorio comercial localizado en Mar Bravo (Santa Elena, Ecuador).



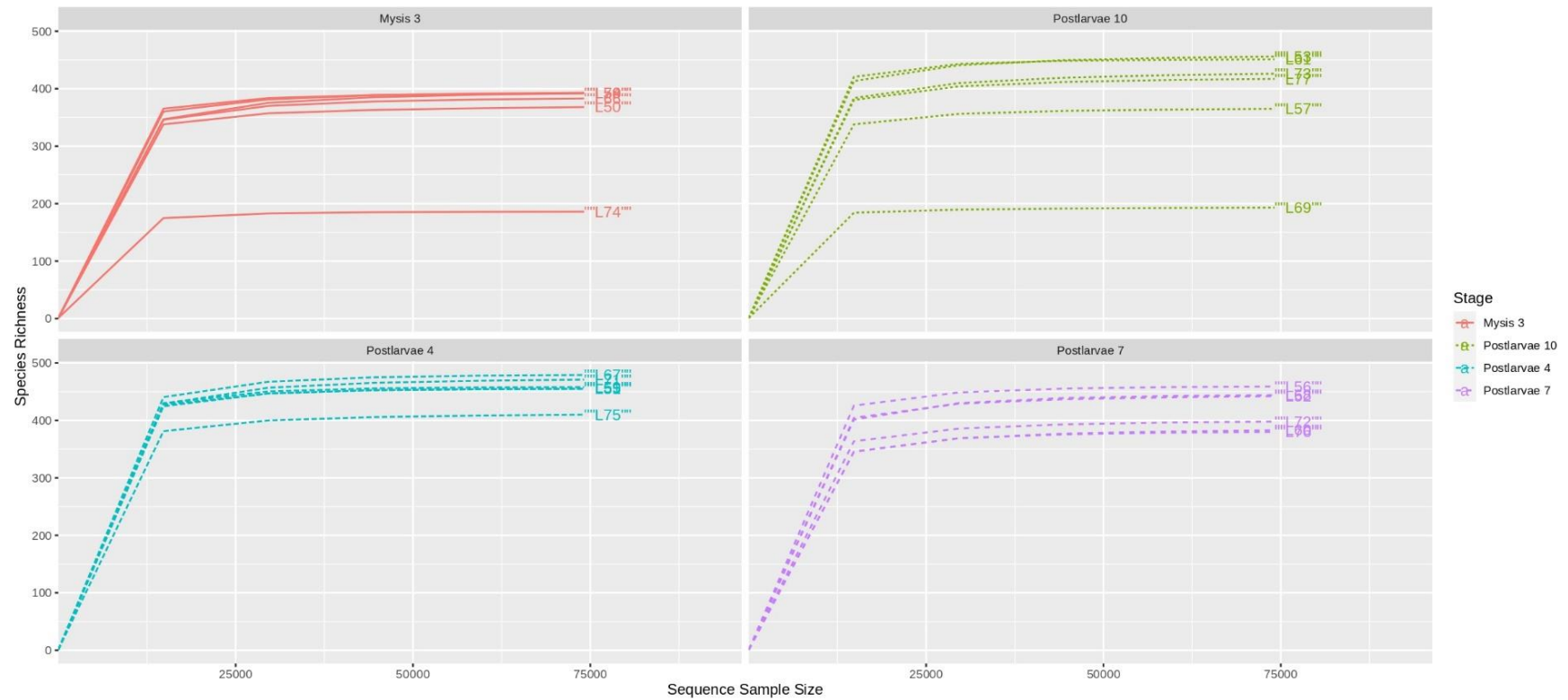
**Figura Suplementaria 2.** Macerado de las muestras y distribución del tejido en crioviales para los distintos análisis.



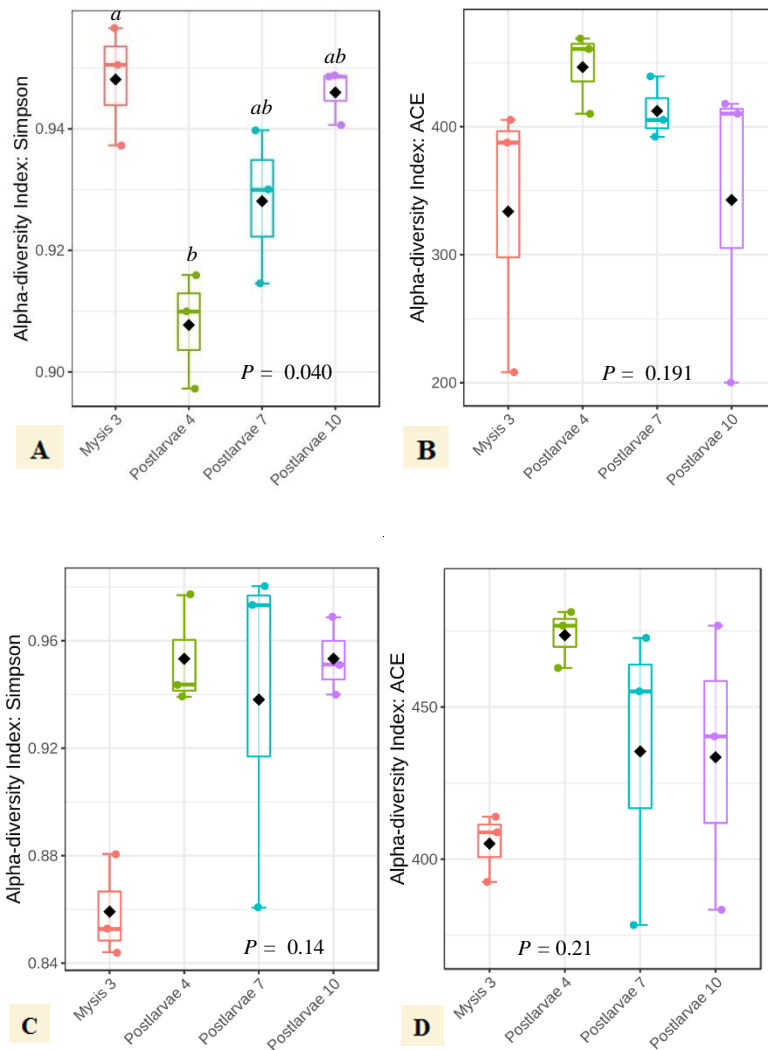
**Figura Suplementaria 3.** Proceso de congelación instantáneo de las muestras (Snapshot), inmersión en nitrógeno líquido por 30 min, distribución de las muestras en cajas y almacenamiento en congelador  $-80^{\circ}\text{C}$ .



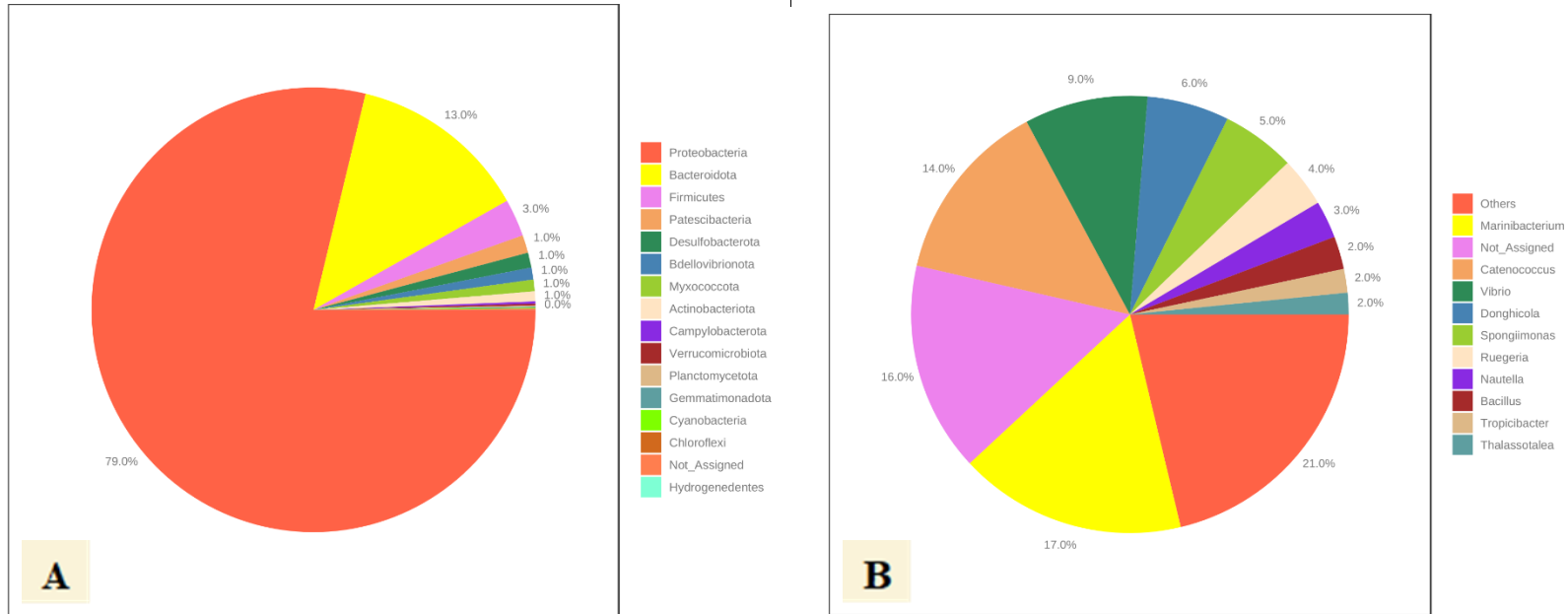
**Figura Suplementaria 4.** **A.** Cultivo enriquecido de larvas de camarón. **B.** Lisis en tampón TE y agitación en un termo-bloque. **C.** Extracción con fenol-cloroformo. **D.** Amplificación de ADN (PCR) para el diagnóstico de los genes  $pirAB^{VP}$  causantes de AHPND.



**Figura Suplementaria 5.** Curvas de rarefacción construida con base en la riqueza de especies y el tamaño de secuencia para el total de estadios larvares de los tanques sanos y afectados por AHPND.

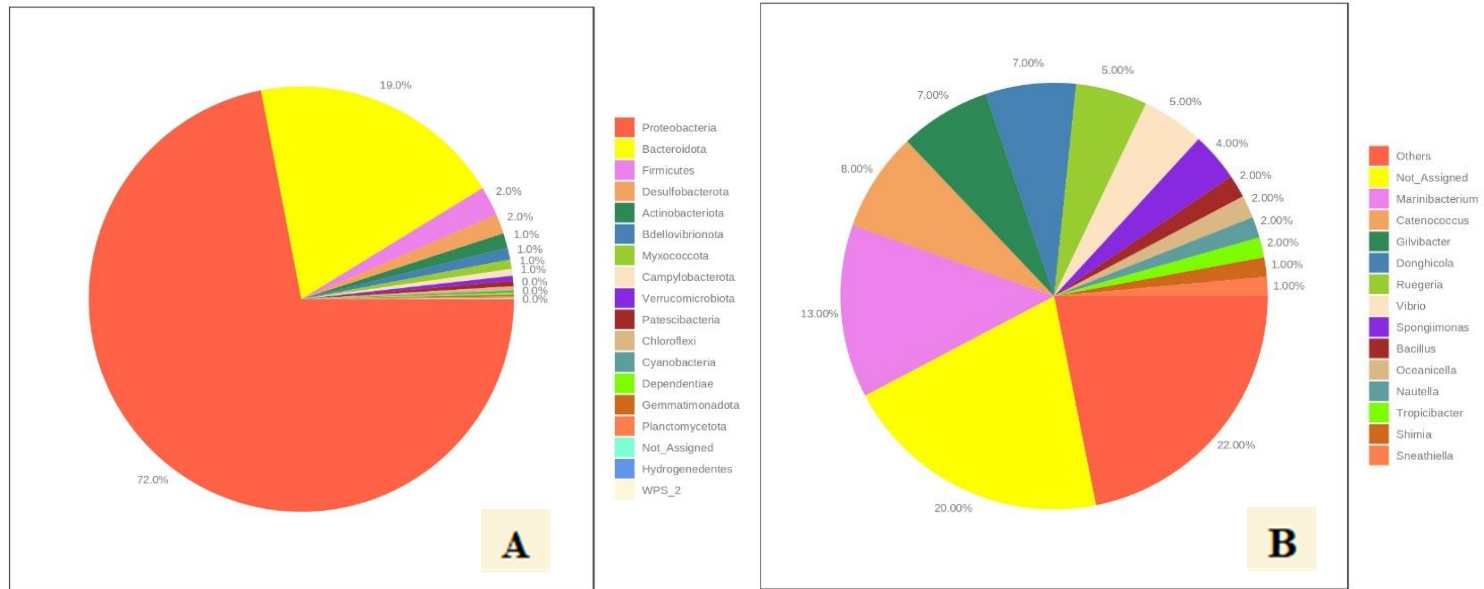


**Figura Suplementaria 6.** Alfa diversidad utilizando Simpson y ACE a nivel de ASV. Cada diagrama de caja representa la distribución de diversidad de un grupo presente dentro de los estadios larvares **A y B**. Tanques sanos. **C y D**. Tanques afectados por AHPND.

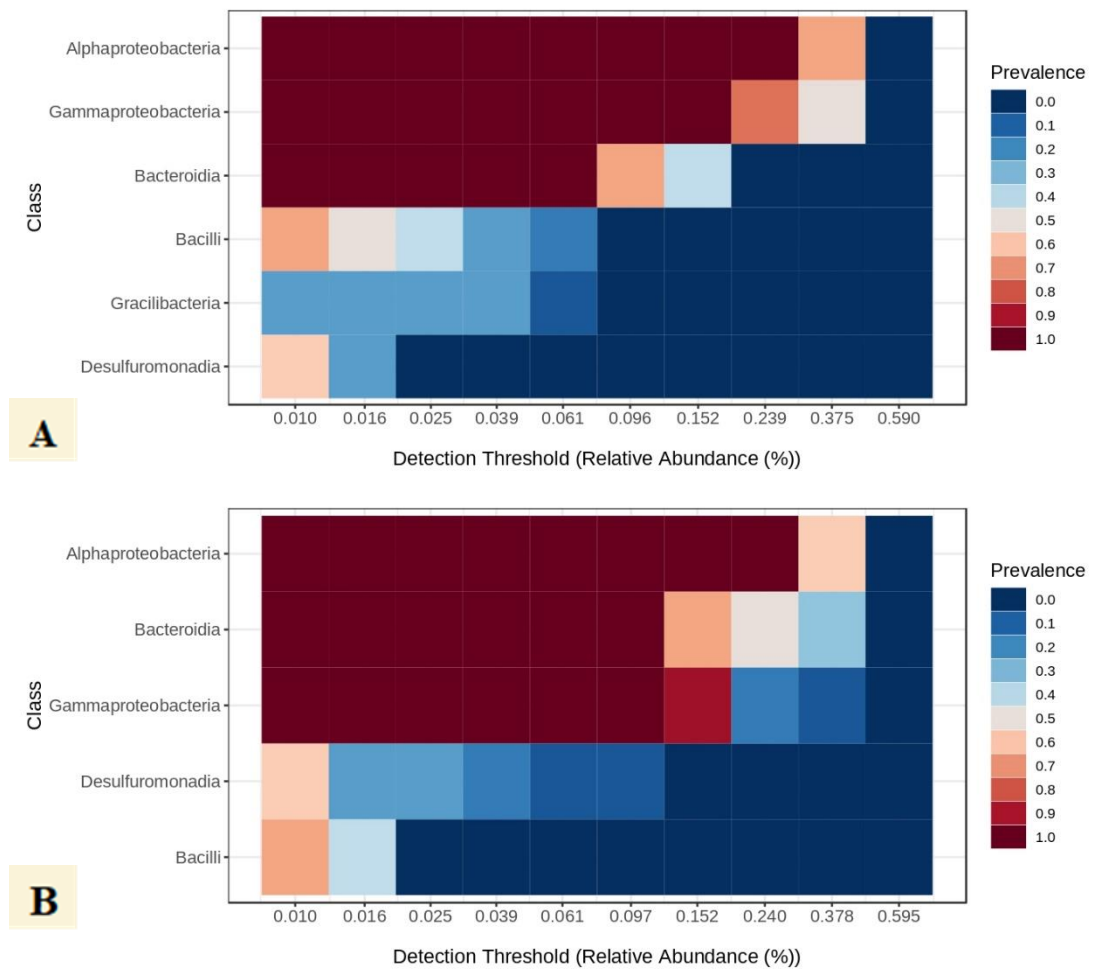


**Figura Suplementaria 7. A.** Proporción total de la distribución del dominio Phylum en los estadios larvarios de tanques sanos. **B.** Proporción total de la distribución a nivel de género.

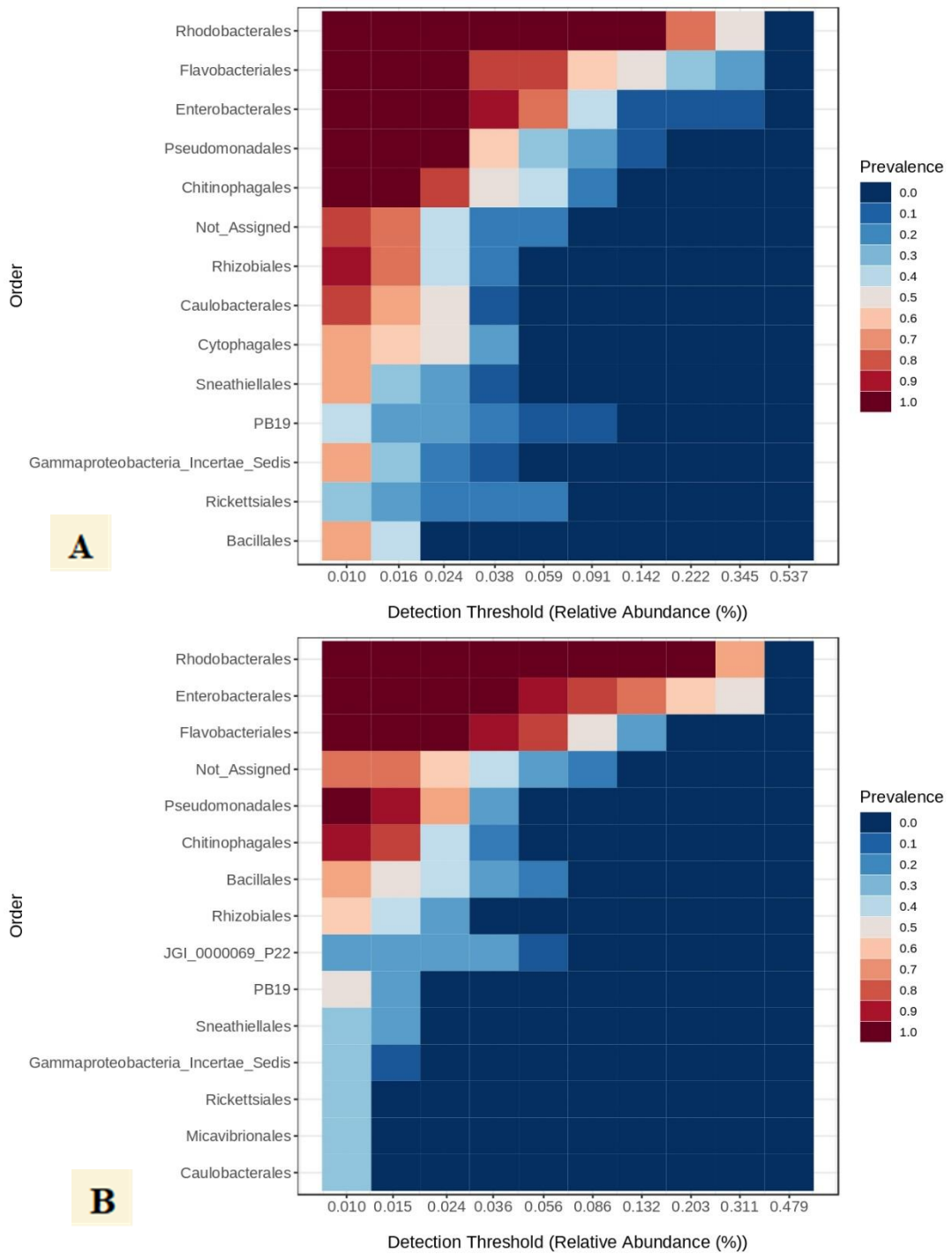




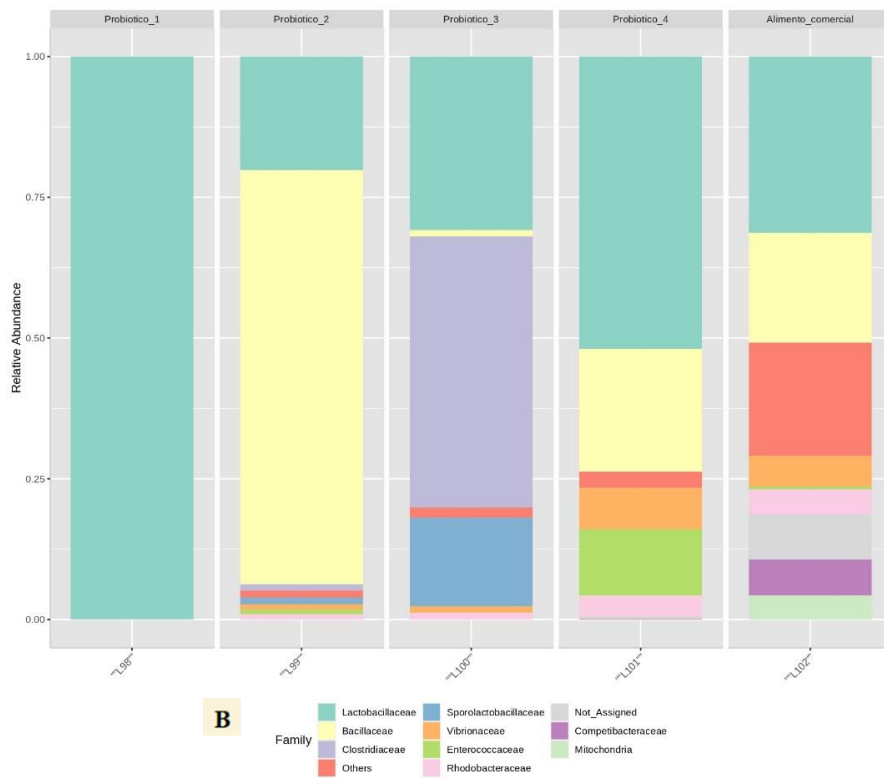
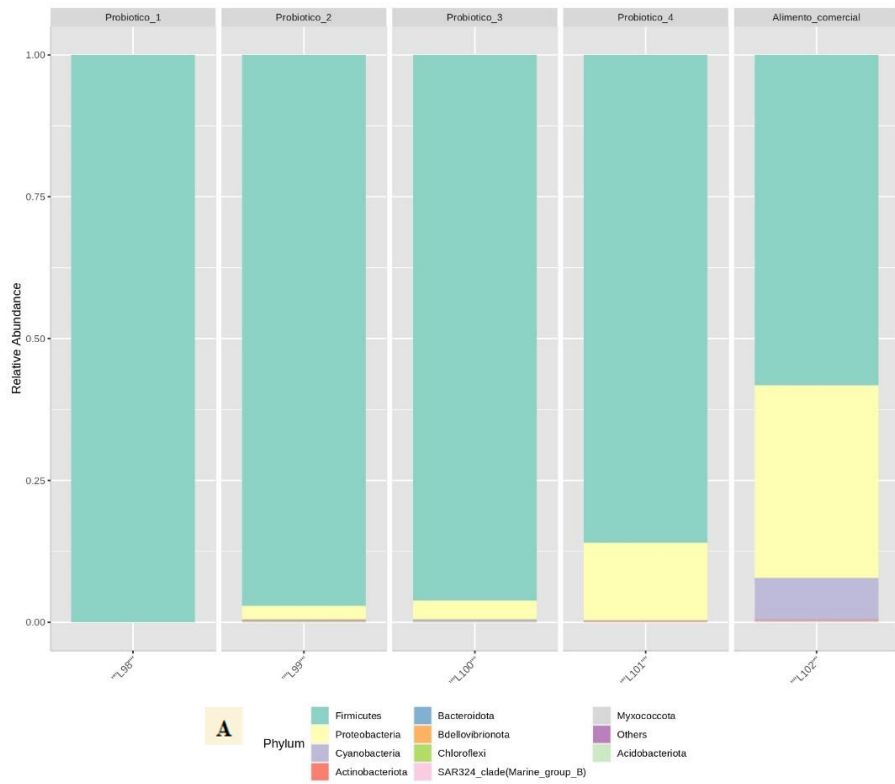
**Figura Suplementaria 8. A.** Proporción total de la distribución del dominio Phylum en los estadios larvarios de tanques afectadas por AHPND. **B.** Proporción total de la distribución a nivel de género.

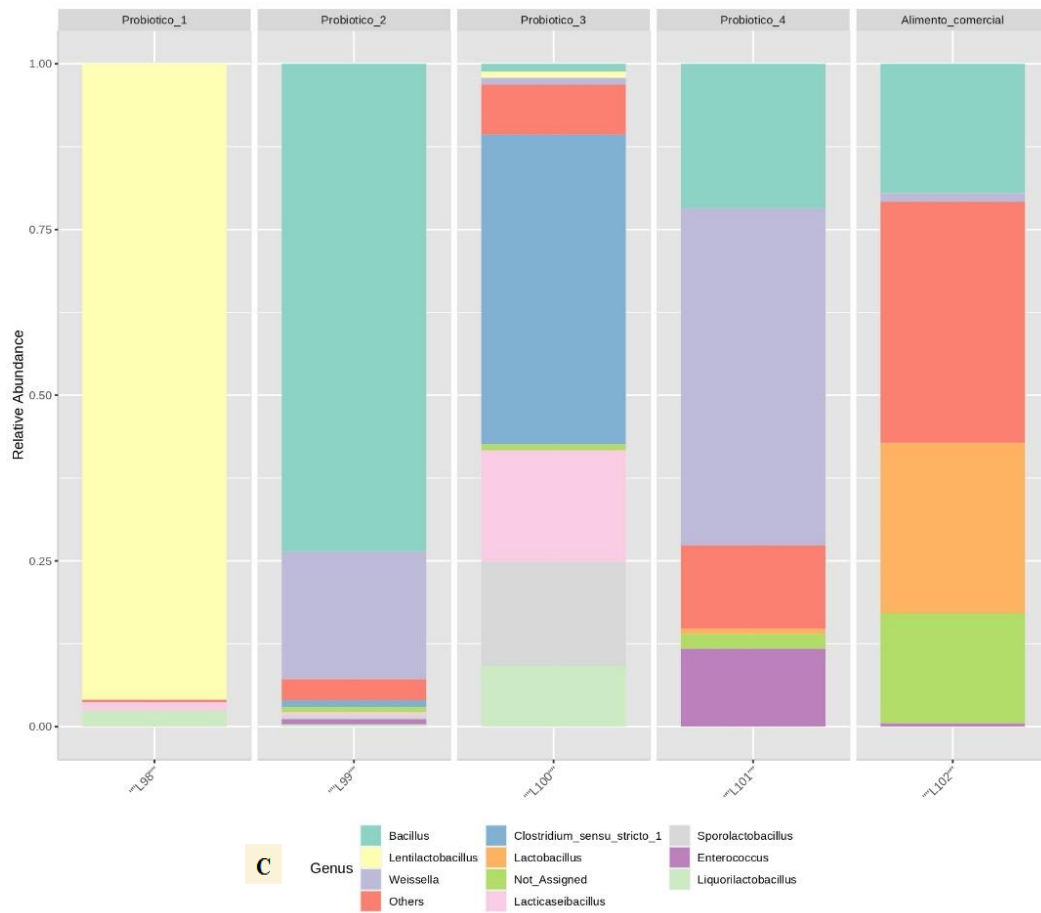


**Figura Suplementaria 9.** Mapa de calor que representa el microbioma central a nivel de Clase **A.** Tanques sanos **B.** Tanques afectados por AHPND.

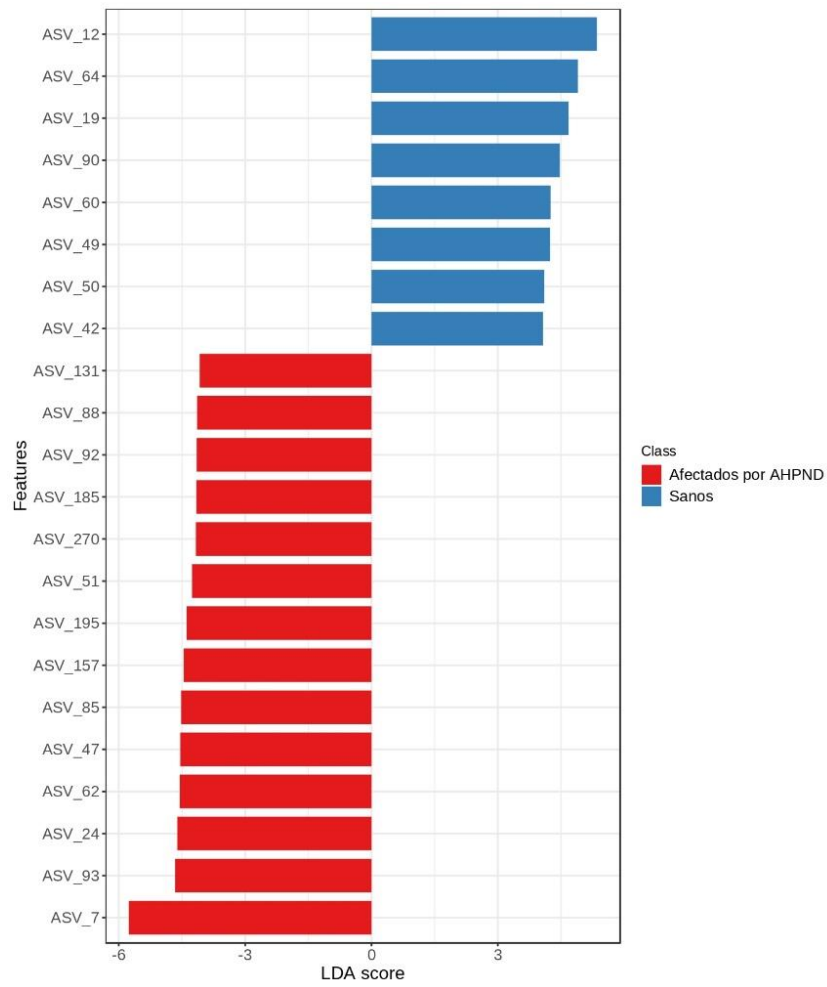


**Figura Suplementaria 10.** Mapa de calor que representa el microbioma central a nivel de Orden **A.** Tanques sanos **B.** Tanques afectados con AHPND.

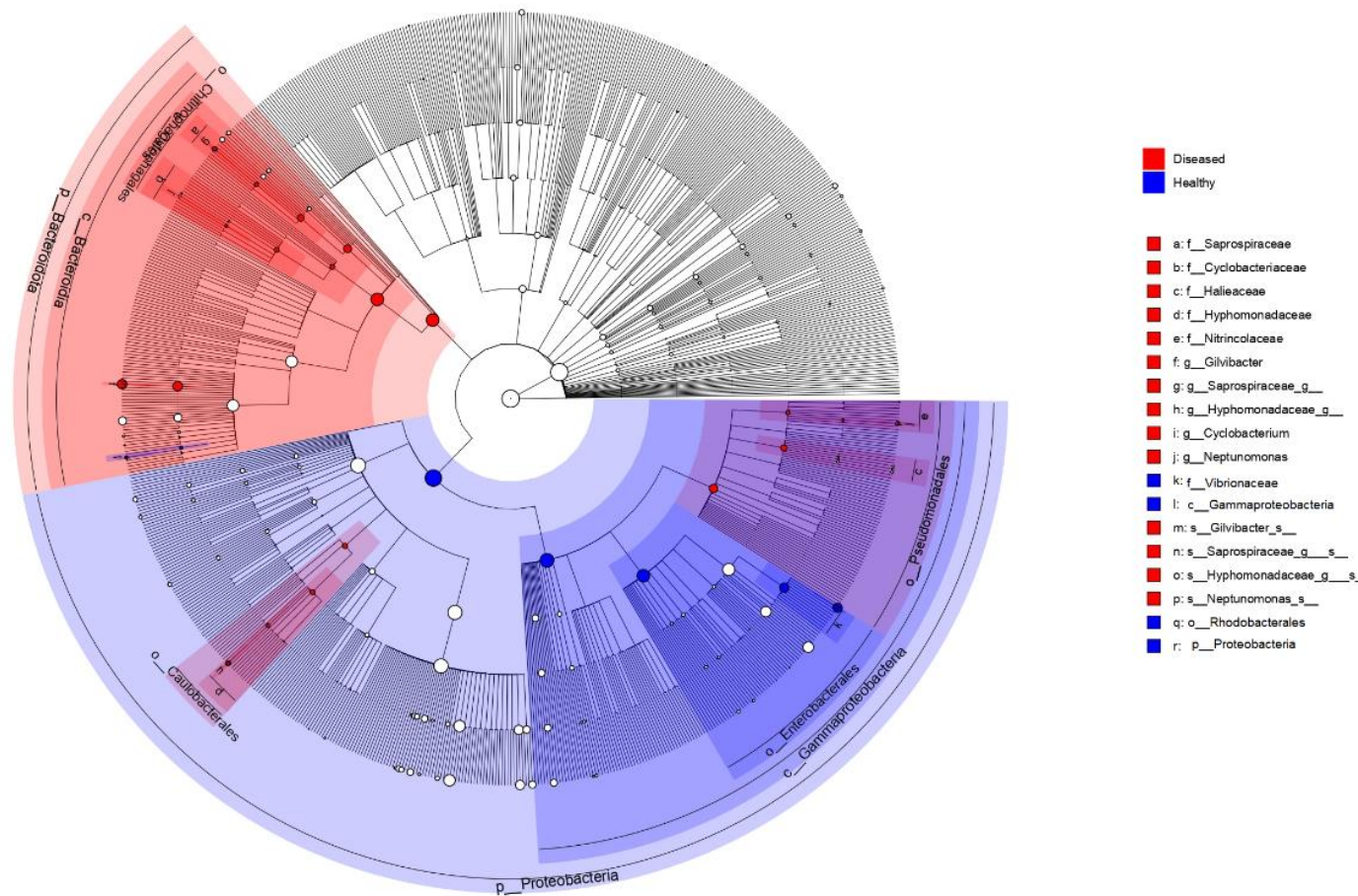




**Figura Suplementaria 11.** Composición taxonómica de la comunidad bacteriana **A.** Comunidad bacteriana de probióticos y alimento a nivel de Phylum **B.** Nivel de Familia y **C.** Nivel de Género.



**Figura Suplementaria 12.** Análisis discriminante lineal (LDA) con tamaño del efecto (LEfSe,  $p < 0.05$ ,  $LDA \geq 4.0 \leq LDA \leq -4.0$ ). La longitud de la barra representa el tamaño del efecto de los linajes bacterianos a nivel de ASV para tanques sanos vs afectados por AHPND.



**Figura Suplementaria 13.** Análisis discriminante lineal con efecto del tamaño (LEfSe,  $p < 0.05$ ,  $LDA\ 4.0 \leq LDA \leq -4.0$ ) representado con un cladograma que muestra las principales familias. El diámetro del círculo es proporcional a la abundancia bacteriana del taxón. En color rojo: Familias bacterianas enriquecidas en tanques afectados por AHPND. En color azul: Familias bacterianas enriquecidas en tanques sanos.